

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Yoann Menon

le jeudi 7 janvier 2016

Titre :

Etude des effets pharmacologiques d'inhibiteurs non nucléosidiques de la
méthylation de l'ADN

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

Unité mixte de Service et de Recherche CNRS/Pierre Fabre n°3388 - ETaC

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Paola B. ARIMONDO

Jury :

Dr. Christophe BLANQUART, Rapporteur

DR. Michaël WEBER, Rapporteur

Pr. Elizabeth MACINTYRE, Examinatrice

Pr. Bernard DUCOMMUN, Examineur

Pr. Jonathan WEITZMAN, Examineur

Dr. Maria DUCA, Examinatrice

Dr. Paola B. ARIMONDO, Directrice de thèse

« Je suis de ceux qui pensent que la science a une grande beauté. [...] Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles. »

Marie Curie (1867-1934)

A Laurence, ma guerrière ...

A nos deux M & M's

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail – le **Pr. Elizabeth Macintyre**, le **Pr. Jonathan Weitzman** et le **Dr. Maria Duca** – et particulièrement les deux rapporteurs de cette thèse – le **Dr. Christophe Blanquart** et le **Dr. Michaël Weber** ainsi que le **Pr. Bernard Ducommun** avec qui j'ai commencé mes gammes en tant que technicien de laboratoire en 1997. Même si ce n'est plus tout à fait hier, les souvenirs de ces débuts sont toujours bien présents et cette expérience a constitué le début de ce chemin.

Je tiens à remercier tout spécialement **Paola Arimondo** qui m'a donné ma chance. Merci de ta confiance, de ton soutien tout au long de ce projet, de m'avoir montré là où l'on pouvait aller, de m'avoir aidé à passer les moments les plus difficiles et d'avoir été présente quand il le fallait. Paola, merci !!!

Merci aussi à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé à un moment ou à un autre au cours de cette thèse: **Natacha Novosad** pour son aide précieuse au laboratoire, **Arnaud Carrier** pour ses analyses avec Ingenuity et nos discussions technico-scientifique (mais pas que), **Anaïs Poulet** pour sa bonne humeur lors des longues purifs de DNMT3A. Merci à **Martine Maitre** que j'ai si souvent sollicité pour mes séquençages, **Tatiana Shorstova et Marianne Spruijt** que j'ai eu le plaisir d'encadrer tout au long de leur stage de master et qui m'ont aidé à mettre en place et réaliser les si longues manips de NOMeSeq et de CHIP. Merci à **Fanny Assemat** pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide pour les CHIP. Merci à **Valérie Poughon**, et **Yannick Aussaguès** pour nos échanges au sujet du modèle CMV-Luc. Merci aussi à **Jérôme Besse** pour m'avoir aidé sur les manipulations des données de méthylome.

Je remercie bien sûr toute l'équipe, aussi bien du côté des biologistes que des chimistes. Merci à **Véronique Masson** pour son aide lors des purifications de la DNMT3A et toutes ses manips d'inhibition *in-vitro*. Merci à **Joëlle Riond** et **Chantal Etiévant** pour leurs encouragements et leur grand soutien. Merci à **Ludovic Halby** et **Alexandre Erdmann** pour leur humour et nos blagues de fin de journées. Merci à **Christophe Long**, **Isabelle Pouny** et **Nicolas Molinier** pour leur amitié leur soutien et leur aide. Merci à **Georges Massiot** pour avoir pris la peine et le temps de relire ce

manuscrit, mais aussi pour sa bonne humeur, son expérience et sa motivation contagieuse pour aller courir entre midi et deux. Merci à nos assistantes, passées et présentes, **Agnès Messal**, **Marie-Louise Perez** et **Anne Delpech** pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à tous les autres membres de l'équipe avec qui j'ai partagé mon quotidien avec beaucoup de plaisir tout au long de cette thèse : **Stéphanie Noguès**, **Audrey Cannac**, **Muriel Batut**, **Elodie Rilova**, **Céline Moisson**, **Marie Lopez**, **Dany Pechalrieu**, **Arnaud Samson**, **Frédéric Alby**, **Jacques Fahy**, **Isabelle Carletti**, **Frédéric Cantagrel**, **François Sautel**, **Laurence Fleury**, **Jean-Marc Grégoire** et **Frédéric Ausseil**.

J'adresse des remerciements tout particuliers à mes anciens collègues du CROE avec qui j'ai travaillé pendant de longues et belles années. Je remercie en particulier **Anna Kruczynski** pour son soutien et sa disponibilité, **Viviane Brel**, **Jean-Philippe Annereau**, **Isabelle Vandenberghe**, **Nancy Delmotte**, **Aline Stennevin**, **Jérôme Filiol**, **Nicolas Rahier** et tous les autres pour leur présence, leur sourire quand j'en avais besoin.

Je n'aurais certainement pas réussi à affronter les coups durs pendant ces 3 ans sans le support de mes amis. Un grand merci donc à **Katia**, **Jean-Marc** et **Cathy**, **Céline**, **Caro** et **Louis**, **Katia** et **Yann** pour leur présence à nos côtés depuis quelques années.

Un merci vraiment très spécial à **Laurence**, qui me supporte depuis 18 ans dans toutes mes entreprises et qui est une épouse si extraordinaire. Merci d'être là, debout à mes côtés. Merci à nos amours **Margaux** et **Maxime** qui sont devenus bien trop vite deux grands et forcément beaux, adolescents qui me permettent de vieillir moins vite (à moins que ce ne soit l'inverse ;-).

Mes derniers remerciements, vont à **mes parents** pour m'avoir transmis leur goût du travail et surtout leur soutien dans les moments difficiles. Vous êtes vraiment géniaux !! Merci enfin, à **ma petite soeur** et **Xavier** pour me soutenir, quoi que je fasse.

Merci à tous, pour votre présence, vos conseils, votre aide, vos discussions, votre réconfort, votre bonne humeur, vos sourires, vos rires ...

Table des matières

Remerciements	i
Liste des figures	vii
Liste des tableaux.....	viii
Abréviations	ix
Chapitre 1 – Qu’est ce que l’épigénétique ?	3
1. L’épigénétique en complément de la génétique	3
2. Organisation de l’ADN et régulation de la transcription.....	4
2.1. L’ADN support de l’information génétique	4
2.2. De l’ADN à la chromatine	6
2.2.1. L’organisation de la chromatine	7
2.2.2. Euchromatine et hétérochromatine.....	7
2.2.3. L’organisation des chromosomes dans le noyau	8
2.3. L’ADN non-codant	10
2.3.1. L’ADN codant, par opposition à l’ADN non-codant.....	10
2.3.2. L’ADN non-codant, ADN poubelle ?	10
3. La diversité des modifications épigénétiques	11
3.1. La méthylation de l’ADN.....	12
3.1.1. Lieux et fonction de la méthylation de l’ADN	12
3.1.2. Les méthyltransférases d’ADN (DNMT).....	14
3.1.3. La déméthylation de l’ADN.....	20
3.2. Les modifications post-traductionnelles des histones	21
3.2.1. Une marque épigénétique complexe	21
3.2.2. De nombreux acteurs	23
3.3. Le positionnement des nucléosomes.....	25
3.4. Les ARN non codants	26
3.4.1. Les petits ARN non codants.....	26
3.4.2. Lien entre ARNnc et méthylation de l’ADN	27
4. Des mécanismes coopératifs	28

Chapitre 2 – L'épigénétique dans le cancer	31
1. Le cancer.....	31
1.1. Une maladie mondiale	31
1.2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses.....	32
1.3. D'une cellule saine à une cellule cancéreuse	34
2. Le contexte épigénétique du cancer	35
2.1. Une dérégulation de la méthylation de l'ADN	35
2.1.1. L'hypométhylation globale du génome.....	36
2.1.2. L'hyperméthylation spécifique de certains îlots CpG.....	37
2.2. Une dérégulation des marques d'histones	40
2.2.1. Quelles modifications ?	40
2.2.2. Avec quels acteurs ?	40
2.3. Dérégulation du positionnement des nucléosomes	40
2.4. Une dérégulation des ARN non-codants	41
3. En résumé.....	42
Chapitre 3 – L'épigénétique : une cible thérapeutique	43
1. Le caractère réversible des marques épigénétiques.....	43
1.1. Quelle(s) modification(s) faut-il cibler ?	43
1.2. Effacer les modifications d'histones.....	44
1.2.1. Les HDACs déacétylent les histones.....	44
1.2.2. Les HDMs déméthylent les histones	44
1.3. Effacer la méthylation de l'ADN	45
2. La thérapie épigénétique dans le cancer	46
2.1. Les inhibiteurs des modifications d'histones	46
2.1.1. Les inhibiteurs de HDACs.....	46
2.1.2. Les inhibiteurs de HMTs	47
2.1.3. Les inhibiteurs de HDMs.....	49
2.2. Les inhibiteurs de DNMTs.....	50
2.2.1. Les inhibiteurs nucléosidiques	50
2.2.2. Les inhibiteurs non-nucléosidiques	54
2.3. Quelles perspectives pour les inhibiteurs de DNMTs ?	59
Objectifs de la thèse.....	62

Chapitre 4 – Mesurer l’inhibition des DNMTs.....	67
1. Deux tests pour un criblage HTS.....	67
1.1. Un test enzymatique d’inhibition de DNMT3A	67
1.1.1. Principe du test enzymatique.....	67
1.1.2. Protocole expérimental.....	68
1.2. Un test cellulaire : KG1 CMV-Luc.....	69
1.2.1. Principe du test cellulaire	69
1.2.2. Protocole expérimental.....	70
2. Analyse de la méthylation de l’ADN au niveau de promoteurs de Gènes Suppresseurs de Tumeurs.....	71
2.1. Lignées cellulaires utilisées et traitements	71
2.2. La conversion de l’ADN par le bisulfite de sodium.....	72
2.3. Les techniques utilisées.....	74
2.3.1. Le bisulfite clonage séquençage (BCS)	74
2.3.2. L’analyse par restriction combinée au bisulfite (COBRA).....	75
2.3.3. La methyl-spécific PCR (MSP)	76
2.3.4. Le méthylome.....	77
2.3.5. Commentaires	78
2.3.6. La methyl-specific restriction qPCR (MSRqPCR).....	79
2.4. Régions analysées et oligonucléotides utilisées.....	80
3. Caractérisations de nouveaux inhibiteurs de DNMTs.....	82
3.1. Méthylation de l’ADN et conformation de la chromatine	83
3.1.1. Notre modèle d’étude : CMV-Luc.....	83
3.1.2. Mesure de l’occupation des nucleosomes et de la méthylation de l’ADN par séquençage (NOMeSeq).....	84
3.2. Modifications des marques d’histones et recrutement des facteurs de transcription.....	88
3.2.1. Approche expérimentale sur le modèle CMV-Luc.....	88
3.2.2. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	90
Chapitre 5 – Caractérisation de nouveaux inhibiteurs de DNMTs	97
1. Inhibiteurs de type flavanones.....	97
1.1. Contexte de l’étude	97
1.2. Publication.....	99
1.3. Remarques complémentaires	147
1.3.1. Méthylation spécifique et méthylation globale	147

1.3.2. Modèle KG1 CMV-Luc et cinétique de traitement	148
2. Inhibiteurs de type bi-substrats	149
2.1. Contexte de l'étude	149
2.2. Publication	150
Chapitre 6 – Conclusions et perspectives.....	163
Annexe A.1.....	176
Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies.....	177
Annexe A.2.....	191
Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino- <i>N</i> -(4-aminophenyl)benzamide Analogues of Quinoline-Based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation.	191
Annexe A.3.....	205
Design and synthesis of new non nucleoside inhibitors of DNMT3A.	205
Annexe A.4.....	215
Identification and optimisation of hydrazone-gallate derivatives as specific inhibitors of DNA methyltransferase 3A.	215
(2015) soumis à <i>Future medicinal chemistry</i>	215
Références.....	229

Liste des figures

Figure 1. Structure de l'acide désoxyribonucléique.	5
Figure 2. De l'ADN aux chromosomes.	6
Figure 3. Euchromatine et hétérochromatine.	8
Figure 4. Organisation de la chromatine dans le noyau.	8
Figure 5. Territoires chromosomiques et agencement radial du noyau.	9
Figure 6. L'ADN non-codant.	11
Figure 7. Répartition des CpG.	13
Figure 8. Structure des différentes DNMT humaines.	15
Figure 9. Représentation spatiale de la Dnmt1.	16
Figure 10. Mécanisme d'action des méthyltransférases d'ADN.	18
Figure 11. Représentation spatiale du complexe Dnmt3A/Dnmt3L.	19
Figure 12. Représentation schématique d'un nucléosome.	22
Figure 13. Modifications post-traductionnelles des histones.	22
Figure 14. Positionnement des nucléosomes sur un gène.	26
Figure 15. Epigénome et organisation chromatinienne.	29
Figure 16. Caractéristiques des cellules cancéreuses et complexité d'une tumeur.	33
Figure 17. Le paradoxe de la théorie des mutations somatiques.	35
Figure 18. Profil de méthylation de l'ADN inversé dans les cellules cancéreuses.	36
Figure 19. Les histones déméthylases.	45
Figure 20. Les inhibiteurs de HDMs.	49
Figure 21. Mécanisme de méthylation de la cytosine par les DNMTs.	50
Figure 22. Les analogues de nucléosides inhibiteurs de DNMT.	52
.....	55
Figure 23. Les inhibiteurs de DNMT non nucléosidiques.	55
Figure 24. Test enzymatique d'inhibition de DNMT3A.	67
Figure 25. Système rapporteur CMV-Luc dans les cellules KG-1.	70
Figure 26. Chronogramme des traitements et analyses cellulaires.	72
Figure 27. Conversion d'une cytosine en uracile par le bisulfite de sodium.	72
Figure 28. Méthylation du promoteur CMV.	84
Figure 29. Principe du NOMeSeq.	85
Figure 30. Localisation des facteurs de transcription sur la séquence promotrice CMV.	89
Figure 31. Profil de méthylation du promoteur CMV, positions des facteurs de transcription et des séquences analysées par ChIP-qPCR.	89
Figure 32. Sonication de la chromatine.	91
Figure 33. Spécificité des couples d'oligonucléotides utilisés dans nos expériences de ChIP.	93
.....	163
Figure 34. Utilisation du terme "épigénétique" dans les titres des publications scientifiques.	163
.....	167
Figure 35. Déméthylation passive de l'ADN.	167
Figure 36. Déméthylation du promoteur CMV et expression de la luciférase.	170
Figure 37. Ouverture de la chromatine de CMV et expression de la luciférase.	171

Liste des tableaux

Tableau 1. Fonctions des modifications post-traductionnelles des histones.	23
Tableau 2. Les acteurs du paysage épigénétique.....	24
Tableau 3. Gènes hyperméthylés dans les cancers.	38
Tableau 4. Les inhibiteurs de HDAC.	48
Tableau 5. Les différentes méthodes utilisées pour nos analyses de la méthylation de l'ADN (après conversion au bisulfite de sodium).	73
Tableau 6. Oligonucléotides utilisés et techniques associées.	81
Tableau 7. Anticorps utilisés dans les expériences de ChIP.....	92

Abréviations

5azaC	5-azacytidine
5azadC	5-aza-2'-désoxycytidine
5hmC	5-hydroxyméthylcytosine
5mC	5-méthylcytosine
5'UTR	5' UnTranslated Region
A	Adénine
a.a.	Acide aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AID / APOBEC4	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 4
AML	Acute Myeloid Leukemia, leucémie aiguë myéloïde
AID1A	AT Rich Interactive Domain 1A
AraC	Arabinosylcytosine, Cytosine arabinoside (Cytarabine)
ARN	Acide RiboNucléique
ARNmi	Micro-ARN
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non-codant
ARNpi	ARN interagissant avec PIWI
ARN Pol II	Polymérase de l'ARN de type II
ARNsi	Petit ARN interférent
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
BAH1/2	Bromo-adjacent homology domain 1/2
BCS	Bisulfite clonage séquençage
BER	Base Excision Repair
BIOT	Biotine
BISMA	Bisulfite sequencing methylation analysis
BRCA1	Breast cancer 1
BSA	Bovine serum albumin, albumine sérique bovine
C	Cytosine
CDH1	Cadhérine E
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)
hCE-1	Human Carboxylesterase 1
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CMML	Chronic myelomonocytic leukaemia
CMV	Cytomegalovirus
COBRA	Combined bisulfite restriction analysis

CpG	Dinucléotide CG
CREB	c-AMP response element-binding protein
CXXC	Domaine d'interaction avec Zn(II)
DMAP1	DNA methyltransferase 1 associated protein 1, protéine 1 associée à la DNMT1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNMT	DNA methyltransferase, méthyltransférase d'ADN
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides (désoxy-adénine-triphosphate, désoxy-thymine-triphosphate, désoxy-guanine-triphosphate, déoxys-cytosine-triphosphate)
EC₅₀	Concentration efficace médiane à laquelle on observe la moitié de l'effet maximum mesuré sur un phénomène biologique
EDTA	Acide éthylène-diamide-tétraacétique
EGCG	Epigallocatechine gallate, gallate d'épigallocatechine
EHMT2	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2, aussi appelée G9a
EMA	European medicines agency
EZH2	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FAM	Fluorescein
FDA	U.S. Food and drug administration
FI	Facteur d'induction
G	Guanine
GASC1	Gene Amplified In Squamous Cell Carcinoma 1, voir aussi JMJD2C
GFP	Green fluorescent protein
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
H2A	Histone 2A
H2B	Histone 2B
H3	Histone 3
H4	Histone 4
HAT	Histone acetyltransferase, acétyltransférase d'histone
HDAC	Histone deacetylase, désacétylase d'histone
HDM	Histone demethylase, déméthylase d'histone
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMT	Histone methyltransferase, méthyltransférase d'histone
HP1	Heterochromatin protein 1
HPV	Human papillomavirus, papillomavirus humain
IARC	International agency for research on cancer
IC₅₀	Concentration inhibitrice pour laquelle on observe 50% de l'inhibition d'un phénomène biologique
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IGF2	Insulin-Like Growth Factor 2
IgG	Immunoglobulines de type G

JHDM	Jumonji domain-containing histone demethylase
JMJD	Jumonji C domain-containing demethylases, voir aussi GASC1
JQ1	Inhibiteur de bromodomain (nommée en l'honneur du chimiste Jun Qi)
K	Lysine
kb	kilobase
KDM	Lysine déméthylase
KG	Dipeptide lysine glycine
LB	Lysogeny broth medium (ou milieu Luria-Bertani)
Let-7	Lethal 7
LINE	Long Interspersed Nuclear Elements
LRES	Long-range epigenetic silencing
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A (KDM1A)
Luc	Luciférase
MAGE	Melanoma associated antigen
MBD	Methyl-binding domain protein, protéine ayant un domaine se liant à l'ADN
M.CviPI	Methyltransferase gene from <i>Chlorella</i> virus
MDS	Myelodysplastic syndrome, syndrome myélodysplasique
MeCP	Methyl-CpG-binding domain protein, protéine ayant un domaine se liant aux CpG méthylés
MEM	Minimum Essential Medium
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
min	minute
MLH1	MutL homolog 1
MLL1	Mixed lineage leukemia 1
M.SssI	Methyltransferase gene from <i>Spiroplasma</i> sp. strain MQ1
MSP	Methyl-specific PCR, PCR méthyl-spécifique
NAD+	Nicotinamide Adénine Di-nucléotide (coenzyme présent dans les cellules)
NFR	Nucleosome-free region, région sans nucléosome
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NLS	Nuclear localization signal, signal de localisation nucléaire
NOMe-Seq	Nucleosome occupancy and methylome sequencing
NP-40	Nonidet P-40 (octyl phenoxypolyethoxylethanol)
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
Nt	Nucléotide
OMS	Organisation mondiale de la santé
P73	voir TP73
pb	paire de bases
PBD	PCNA-binding domain, domaine d'interaction avec PCNA
PBS	Phosphate buffered saline, tampon phosphate

PBST	PBS + 0,05% de Tween-20
PBST + NaCl	PBST + 500mM de NaCl
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction, réaction en chaîne par polymérase
PDB	Protein Data Bank
PHD	Plant homology domain
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRMT	Protein arginine methyltransferases
PTCL	Peripheral T-cell lymphoma
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PWWP	Tryptophane-proline-proline-tryptophane
qPCR	PCR quantitative
R	Purine (guanine ou adénine)
RAS	Rat sarcoma viral oncogene
RdDM	RNA-dependant DNA methylation
RHOB	Ras homolog family member B
RNA Pol.II	ARN polymérase II
ROS	Reactive oxygen species, dérivés réactifs de l'oxygène (radicaux libres)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SAR	Structure-activity relationship, relation structure-activité
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	seconde
SINE	Short Interspersed Nuclear Elements
SIRT1	Sirtuine 1
SMYD3	SET and MYND domain-containing protein 3
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SP1	Specificity Protein 1
T	Thymine
T.A.	Température ambiante
TBE	Tampon Tris-Borate-EDTA
TET	Ten-Eleven Translocation enzymes
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinases-3
Tm	Température de fusion
TP73	Tumor Protein p73 (p73)
TRDMT1	tRNA aspartic acid methyltransferase 1
TRF	Targeting replication foci
TSA	Trichostatine A
TSG	Tumor suppressor gene, gène suppresseur de tumeur
TSS	Transcription start site, site d'initiation de la transcription

U	Unité d'enzyme
UHRF1	Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1
UV	Rayonnement ultraviolet
VHL	von Hippel-Lindau (E3 Ligase)
WIT1	Wilms tumor 1
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
Y	Pyrimidine (cytosine ou thymine)



PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION

Chapitre 1 – Qu'est ce que l'épigénétique ?

L'objectif de ce chapitre est de poser les bases nécessaires à la compréhension des mécanismes épigénétiques.

Aristote (384-322 av. J.-C.) parlait d'une "épigenèse" et nommait ainsi le développement d'un œuf informe de façon graduelle aboutissant à un organisme aux tissus différenciés. Héritière de cette théorie, l'épigénétique a ainsi offert aux embryologistes l'existence possible de mécanismes permettant d'expliquer les phénomènes complexes du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire que la génétique seule ne pouvait expliquer. Denise Barlow ¹ décrit de cette façon l'épigénétique comme " l'ensemble de ces choses bizarres et merveilleuses que la génétique ne sait pas expliquer " (*source www.epigenome.eu*).

1. L'épigénétique en complément de la génétique

Le concept d'épigénétique émerge à une époque où la génétique réalise une avancée importante grâce aux travaux de Thomas Hunt Morgan, au début du XX^{ème} siècle, sur la mutation du gène *white* chez la drosophile (Morgan *et al.*, 1910). Ses recherches permettent de comprendre le rôle joué par les chromosomes dans l'hérédité, alors même que l'acide désoxyribonucléique (ADN) n'est pas caractérisé comme étant le support de l'information génétique. Morgan s'interroge sur le fait que toutes les cellules d'un organisme ne sont pas identiques alors qu'elles partagent les mêmes gènes déterminant les caractères.

Alors que la génétique cherche à comprendre comment sont transmis les caractères, un embryologiste, Conrad H. Waddington (1905-1975), s'intéresse aux phénomènes développementaux par lesquels les gènes et l'environnement peuvent engendrer un phénotype. En 1942, il rassemble les théories de la génétique et du développement sous le terme épigénétique qu'il définit comme « **la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype** » (Waddington, 1942a ; 1942b).

Suite au séquençage complet du génome humain en 2001 il est apparu évident que la séquence de l'ADN n'expliquait pas à elle seule le fonctionnement complet de la cellule. Elle (la séquence) n'explique notamment pas comment les différents types de cellules d'un individu développent des caractères aussi différents que ceux d'un neurone, d'une cellule du foie, des muscles ou de la peau à partir d'un génome identique. En effet, sans nier le dogme central de la génétique (un gène - une protéine), l'incapacité de déchiffrer concrètement dans le génome la totalité des effets phénotypiques met en évidence une intervention externe au génome permettant de réguler l'expression des gènes suivant le rôle de la cellule concernée et de l'environnement.

L'épigénétique dicte en quelque sorte où et quand un gène est exprimé (Sharma *et al.*, 2010) et le profil épigénétique cellulaire est dynamique, du fait de la réversibilité des modifications épigénétiques (Waterland *et al.*, 2006).

L'épigénétique se définit aujourd'hui comme l'ensemble des modifications chimiques (dites marques) apposées sur le génome, orchestrant une organisation du patrimoine génétique en domaines actifs et non actifs, permettant ainsi une sélection et une lecture dirigée de l'information génétique. **Les marques épigénétiques induisent des changements de l'expression des gènes sans modification de la séquence de l'ADN (pas de mutation). Ces marques ont comme propriété d'être à la fois, stables et héréditaires au cours des divisions cellulaires, mais aussi modifiables et/ou réversibles en fonction de l'environnement et ainsi d'avoir des conséquences, à plus ou moins long terme.**

2. Organisation de l'ADN et régulation de la transcription

2.1. L'ADN support de l'information génétique

En 1953, James D. Watson, Francis H.C. Crick et Maurice H.F. Wilkins, avec l'aide des travaux de Rosalind E. Franklin, parviennent à résoudre la structure de l'ADN comme étant une double-hélice formée de deux brins complémentaires antiparallèles (Watson et Crick, 1953). L'ADN est une macromolécule de nucléotides constitués de désoxyriboses phosphatés liés à des bases azotées.

Il existe deux types de bases azotées:

- Les pyrimidines comprenant la thymine (T) et la cytosine (C) ; (et l'uracile (U) pour l'ARN, l'acide ribonucléique).
- Les purines comprenant l'adénine (A) et la guanine (G).

La complémentarité de l'ADN est rendue possible par les interactions entre les bases A-T et G-C [Figure 1].

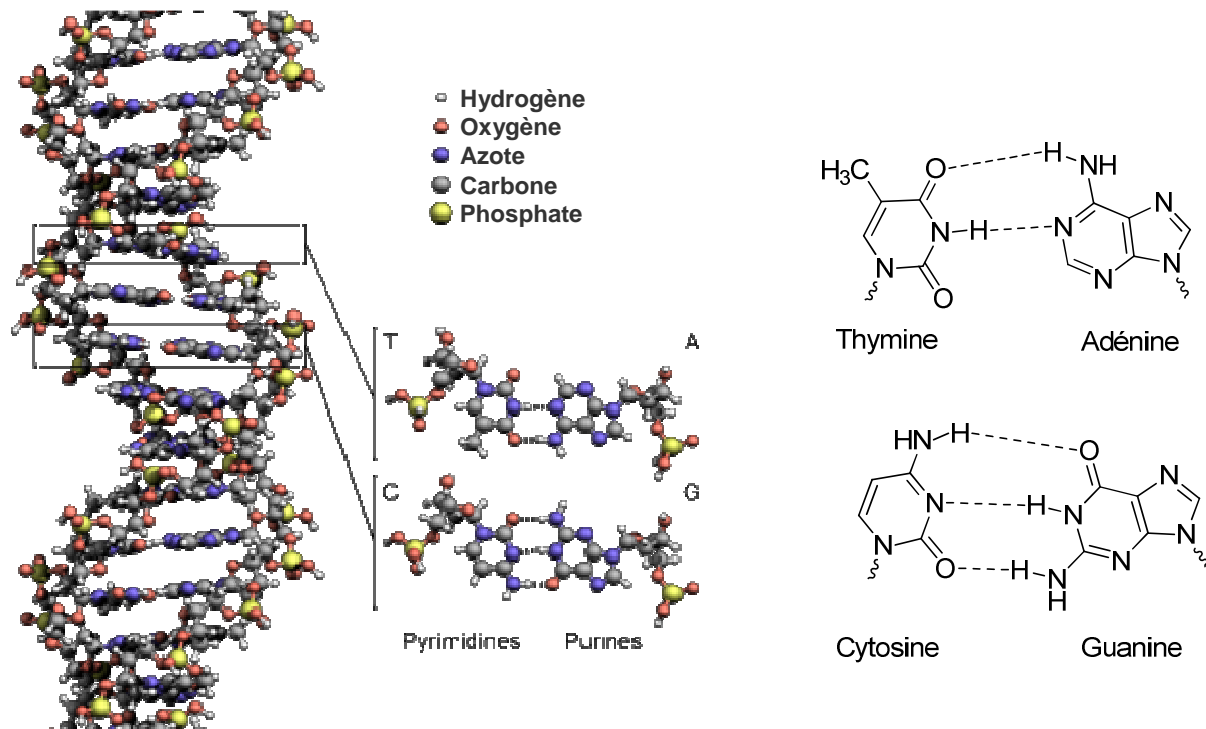


Figure 1. Structure de l'acide désoxyribonucléique.

La complémentarité de l'ADN est rendue possible par les liaisons hydrogènes entre les bases A-T et G-C et la molécule d'ADN a la forme d'une double-hélice antiparallèle. Figure adapté de http://www.wikiwand.com/fr/Acide_désoxyribonucléique.

Ces observations ont alors permis d'émettre l'hypothèse que l'ADN est le support de l'information génétique et que l'hérédité peut être expliquée par un mécanisme de séparation des brins d'ADN suivi d'une duplication. Matthew Meselson et Franklin Stahl démontrent cette théorie en établissant le modèle de réplication semi-conservative (Meselson et Stahl, 1958). Dès lors, les scientifiques se penchent sur le déchiffrement du code génétique : comment un brin d'ADN peut-il être traduit en protéines ? Et dès les années 1960, Robert Holley (Holley et al. 1965a; 1965b), Har Gobind Khorana (Kornberg et al. 1964) et Marshall Nirenberg (Matthaei et al. 1962) déchiffrent ce code.

2.2. De l'ADN à la chromatine

Les cellules somatiques eucaryotes contiennent approximativement six milliards de paires de bases d'ADN, ce qui correspond à une longueur théorique de deux mètres d'ADN. L'intégrité de ce matériel est contenu dans le noyau, dont le diamètre est d'environ dix à vingt microns, ce qui implique que l'information génétique soit extrêmement compactée (Alberts *et al.*, 2008). Pour cela, l'ADN s'associe à des protéines, les histones, qui sont en charge d'organiser le contenu nucléaire en une structure dense appelée chromatine (Van Holde, *et al.*, 1974). Par ailleurs, une autre partie de l'information génétique, permettant d'assurer les principales fonctions cellulaires, doit être accessible en permanence, comme les gènes dits « de ménage ».

L'organisation de la chromatine comporte ainsi différents niveaux (Felsenfeld and Groudine, 2003) [Figure 2].

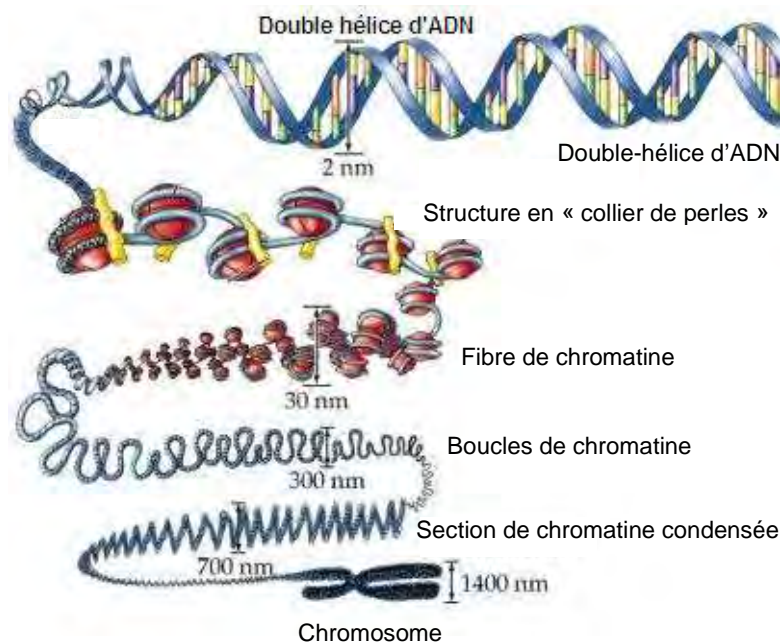


Figure 2. De l'ADN aux chromosomes.

La double-hélice d'ADN s'enroule autour d'histones pour former des nucléosomes. La succession de nucléosomes forme une structure en « collier de perles » de 11 nm de diamètre. A un niveau supérieur, la compaction est rendue plus forte pour former la fibre de chromatine de 30 nm de diamètre. Enfin, des repliements successifs forment des chromosomes. Figure tirée de (Felsenfeld and Groudine, 2003).

2.2.1. L'organisation de la chromatine

Au niveau de l'organisation primaire de la chromatine, l'ADN est compacté en **nucléosomes**, unités fondamentales de la chromatine, comprenant chacun 147 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones et un ADN de liaison au nucléosome suivant (Luger *et al.*, 1997) [Figure 2]. Ces histones sont de petites protéines extrêmement conservées au cours de l'évolution comportant un domaine central et des extrémités qui sortent du nucléosome et qui sont le siège de diverses modifications post-traductionnelles (décrites en § 3.2.1). La structure primaire en « **collier de perles** » constituée de l'enchaînement des nucléosomes a un diamètre de 11 nm et constitue le premier niveau de compactage de la chromatine (Felsenfeld and Groudine, 2003).

En plus de l'enroulement de la molécule d'ADN autour de l'octamère d'histones, la compaction peut être rendue encore plus importante par la liaison de l'histone H1 au nucléosome et à l'ADN de liaison. Cette structure de 30 nm de diamètre forme la **fibres de chromatine** (Robinson *et al.*, 2006).

Le repliement de la fibre de chromatine en un niveau de compaction supérieur forme une fibre de 300 nm de diamètre comprenant des **boucles de chromatine**. Enfin, les niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine conduisent à la formation des **chromosomes** [Figure 2].

2.2.2. Euchromatine et hétérochromatine

A la fin de la mitose, la chromatine condensée sous forme de chromosomes bien visibles se décondense partiellement et s'ouvre pour laisser l'ADN accessible. La chromatine décondensée est alors appelée **euchromatine** et comprend des domaines de chromatine active. Elle est riche en gènes et sa structure ouverte la rend relativement accessible aux enzymes nécessaires à la transcription, telle que la polymérase d'ARN de type II. La partie de la chromatine qui reste fortement condensée est appelée **hétérochromatine**. Elle est pauvre en gènes et peu accessible à la transcription (Tamaru, 2010) [Figure 3].

On distingue l'**hétérochromatine constitutive** qui est définie comme la chromatine qui reste condensée dans tous les types cellulaires, généralement au niveau des centromères et télomères des chromosomes, et l'**hétérochromatine facultative** qui est définie comme de l'euchromatine qui est mise en silence dans certains types cellulaires ou à certains stades du développement (Tamaru, 2010).

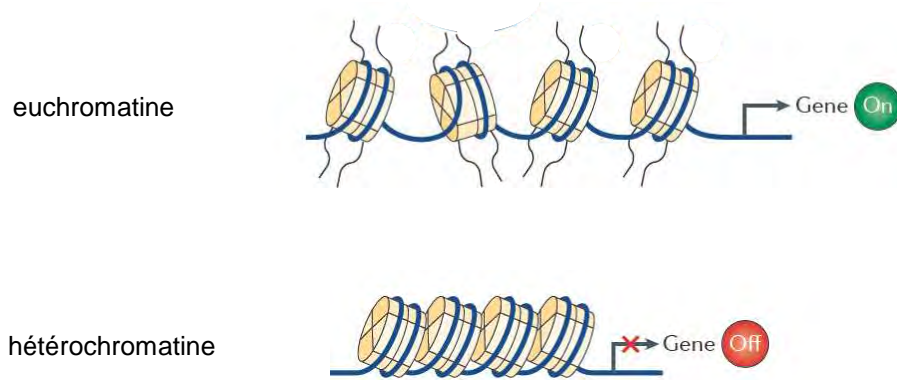


Figure 3. Euchromatine et hétérochromatine.

L'euchromatine est la configuration ouverte de la chromatine, accessible à la machinerie transcriptionnelle. Au contraire, l'hétérochromatine est une forme condensée de la chromatine associée à un état répressif de la transcription.

2.2.3. L'organisation des chromosomes dans le noyau

Les chromosomes sont contenus dans le noyau, qui sépare le génome du cytoplasme, et joue un rôle important dans l'organisation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes.

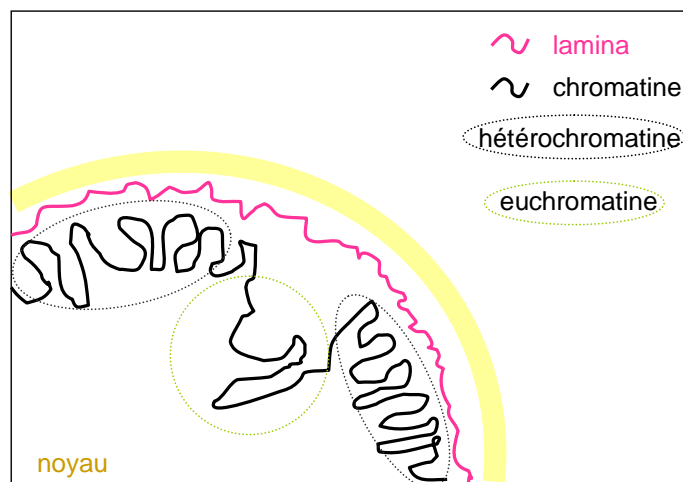


Figure 4. Organisation de la chromatine dans le noyau.

Au niveau de la lamina se trouvent des domaines d'hétérochromatine tandis que l'euchromatine se trouve préférentiellement vers le centre du noyau. Figure adaptée de (van Steensel and Dekker, 2010).

Le noyau est délimité par une double membrane nucléaire. Accolée à sa face interne, se trouve la **lamina**, ensemble de filaments intermédiaires de lamines et d'autres protéines, essentielle dans l'organisation de la chromatine (Guelen *et al.*, 2008).

Elle est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes en interagissant avec de nombreux régulateurs transcriptionnels et participe à l'organisation de l'hétérochromatine. Les domaines associés à la lamina sont donc des domaines où la chromatine se trouve sous forme d'hétérochromatine, tels que les centromères, télomères ou les gènes dont la transcription est réprimée (Guelen *et al.*, 2008). Ces domaines se retrouvent donc préférentiellement à la périphérie du noyau [Figure 4].

Hormis la localisation périphérique de l'hétérochromatine, l'arrangement chromosomique dans le noyau est également organisé. A l'interphase, les chromosomes occupent des régions appelées **territoires chromosomiques** contenant chacun un seul chromosome (Cremer and Cremer, 2010). L'agencement des territoires chromosomiques les uns par rapport aux autres n'est pas aléatoire. Les petits chromosomes sont préférentiellement situés vers l'intérieur du noyau et les chromosomes plus grands vers la périphérie (Sun *et al.*, 2000) [Figure 5].



Figure 5. Territoires chromosomiques et agencement radial du noyau.

Les chromosomes sont arrangés en territoires chromosomiques au sein du noyau ; chaque territoire contenant un chromosome. L'agencement radial au sein du noyau est dépendant de la taille et de la richesse en gènes des chromosomes.

Le contenu nucléaire est également important puisqu'à taille égale, un chromosome pauvre en gènes (comme le chromosome 18) est situé plus en périphérie qu'un chromosome plus riche en gènes (comme le chromosome 19) (Croft *et al.*, 1999). Cette

constatation est toutefois nuancée par le fait que l'agencement des territoires chromatinien peut varier d'un type cellulaire à l'autre (Parada *et al.*, 2004).

Au sein d'un territoire chromosomique, la localisation des gènes semble également être liée à leur expression. Les gènes transcriptionnellement actifs étant préférentiellement localisés en périphérie du territoire (Kurz *et al.*, 1996). L'hypothèse actuelle serait que cette organisation favoriserait les interactions inter-chromosomiques (Branco and Pombo, 2006) (<http://www.mechanobio.info>).

2.3. L'ADN non-codant

2.3.1. L'ADN codant, par opposition à l'ADN non-codant

Les **régions codantes** de l'ADN sont définies comme les régions du génome qui codent pour les protéines. Elles consistent en des séquences de nucléotides qui correspondent à des séquences d'acides aminés formant des protéines. Ces portions codantes sont constituées d'exons et sont interrompues par des sections non codantes, les introns, l'ensemble formant un gène.

Le génome humain comporte près de 21 000 gènes codants pour des protéines (ENCODE Project Consortium, 2012). Ces régions codantes ne représentent que 2 % du génome (Palazzo and Gregory, 2014 ; Lander *et al.*, 2001) et sont fortement conservées entre les espèces (Venter *et al.*, 2001). Le reste du génome est appelé **ADN non-codant**.

2.3.2. L'ADN non-codant, ADN poubelle ?

L'ADN non-codant constitue environ 98 % du génome humain et a longtemps été appelé « ADN poubelle » car il était considéré comme non-fonctionnel (Britten and Kohne, 1968 ; Ohno, 1972). Les études de génomiques étant alors centrées sur l'analyse des régions codantes.

Cependant, l'existence de séquences conservées dans les régions non-codantes implique qu'elles aient été sous pression de sélection, ce qui est généralement signe de fonctionnalité (Bejerano *et al.*, 2004 ; Pennacchio *et al.*, 2006 ; Ward and Kellis, 2012).

Parmi les fonctionnalités décrites de l'ADN non-codant, on retrouve des éléments impliqués dans la reconnaissance de la machinerie transcriptionnelle et des facteurs de transcription tels que les promoteurs, les *enhancers*, les *silencers* et les *insulators*. L'ADN

non-codant contient également des séquences qui sont transcrites en molécules d'ARN non-codantes mais fonctionnelles telles que les ARNs de transfert, ARNs ribosomaux, micro-ARNs (décrits en § 3.4.1) et longs ARNs non-codants. Enfin, d'autres éléments fonctionnels composent l'ADN non-codant tels que les séquences répétées jouant un rôle structural à l'échelle chromosomique (télomères, centromères), les introns et les origines de réplifications [Figure 6].

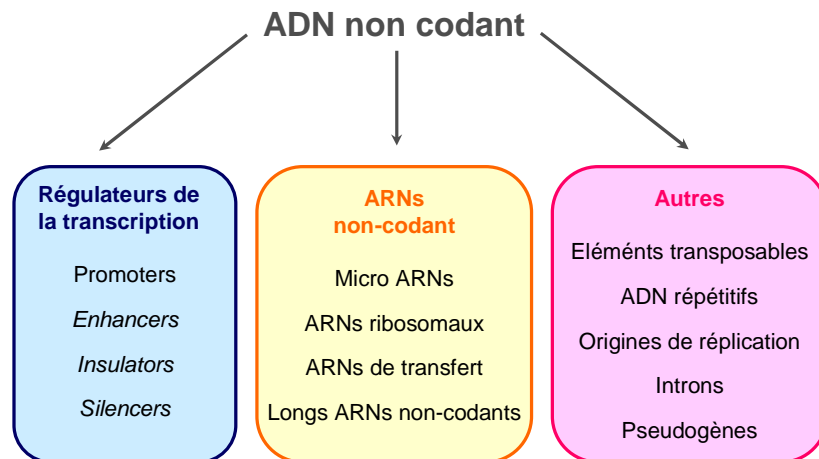


Figure 6. L'ADN non-codant.

L'ADN non-codant comprend des éléments régulateurs de la transcription tels que les promoteurs et *enhancers*, des éléments codants pour des ARNs non-codants, tels que les micro-ARNs et les ARNs ribosomaux et d'autres éléments jouant un rôle structural.

3. La diversité des modifications épigénétiques

L'épigénétique regroupe des modifications chimiques apposées sur l'ADN, comme la méthylation, et de manière plus complexe, sur les histones afin de constituer un étiquetage des régions génomiques concordant avec leur état transcriptionnel. D'autre part, l'organisation spatiale de l'ADN, c'est à dire la manière dont l'ADN est enroulé autour des histones, la nature des histones (variants d'histones), la répartition des nucléosomes, ainsi que leur état de compaction (euchromatine *versus* hétérochromatine) conditionne directement l'accessibilité à l'information génétique. Enfin, les ARN non-codants (ARNnc) sont également capables d'influer sur l'expression des gènes et de diriger la régulation épigénétique.

3.1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN fut la première modification épigénétique découverte et reste la plus étudiée à ce jour. La 5-méthylcytosine est décrite dès 1925 dans l'ADN bactérien et sa caractérisation interviendra 25 ans plus tard (Wyatt, 1950). Puis en 1975, Riggs, Holliday et Pugh émettront l'hypothèse de son implication dans la régulation épigénétique (Choudhuri, 2011).

3.1.1. Lieux et fonction de la méthylation de l'ADN

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu quasi exclusivement sur le carbone 5 des cytosines qui précèdent une guanine, on parle alors de dinucléotides CpG (Razin and Riggs, 1980). La méthylation de cytosines dans des séquences CpA, a également été observée dans les cellules souches ou neuronales (Auclair and Weber, 2012).

Ces dinucléotides CpG ne sont pas uniformément répandus dans le génome étant donné qu'ils ne représentent environ que 0,8% des dinucléotides dans le code génétique des mammifères (contre 5% statistiquement attendus). Il a d'ailleurs été proposé que cette sous-représentation des CpG serait due à l'instabilité chimique des 5-méthylcytosines (5mC) spontanément converties en thymine par déamination (Scarano *et al.*, 1967 ; Schorderet and Gartler, 1992 ; Fryxell and Moon, 2005 ; Simmen 2008).

Les CpG sont organisés selon plusieurs types de régions différentes [Figure 7]:

- **Les îlots CpG** sont définis comme une séquence d'ADN de plus de 500bp, ayant une teneur en CG de plus de 55% et un ratio de CpG observé/attendu supérieur à 0,65 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987; Takai and Jones, 2002 ; Wang and Leung, 2004).
- **Les « rivages » des îlots CpG (shores)**, quant à eux, s'étendent sur 2kb en 5' (North) et en 3' (South) des îlots CpG et possèdent une densité en CG beaucoup plus faible que les îlots (Doi *et al.*, 2009 ; Irizarry *et al.*, 2009).
- **Les « bords » des îlots CpG (shelves)**, sont beaucoup moins riches en CpG et s'étendent entre 2kb et 4kb en 5' et en 3' des îlots CpG.
- Enfin, **les séquences répétées**, telles que les répétitions centromériques ou les rétrotransposons LINE et SINE, portent elles aussi de nombreux CpG (Yoder *et al.*, 1997).

- Au delà de ces régions, on parle d' « **Open Sea** », pour les CpGs isolés dans le reste du génome (Sandoval *et al.*, 2011).

Les rôles respectifs de ces différentes formations sont plus ou moins identifiés et peuvent être très complexes (Suzuki and Bird 2008 ; Reddington *et al.* 2013).

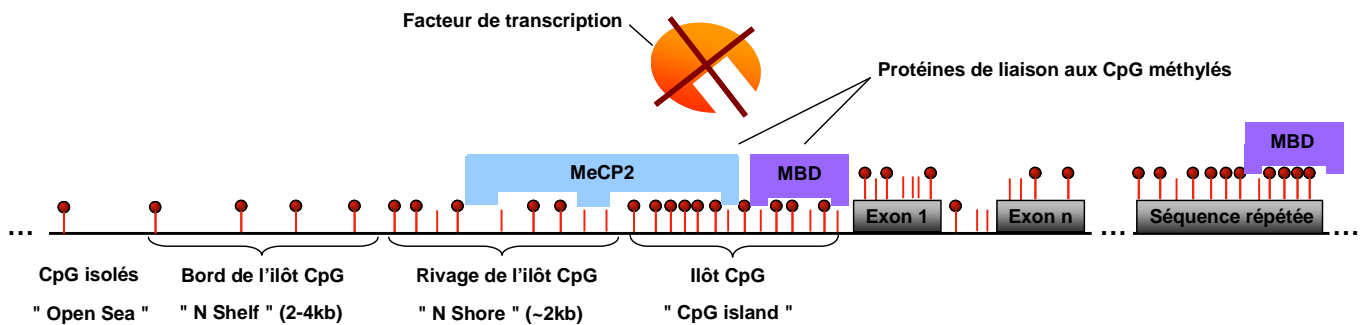


Figure 7. Répartition des CpG.

Les bâtons rouges représentent des CpGs, les sphères rouges représentent des groupements méthyles et l'ADN est symbolisé par une ligne noire.

Chez l'homme, **les îlots CpG**, généralement déméthylés, sont concentrés dans les régions promotrices des gènes. Près de 65% des gènes possèdent dans leur région 5' (promoteur, 5'UTR et premier exon) un îlot CpG (Davuluri *et al.*, 2001; Marino-Ramirez *et al.*, 2004). Les autres régions comme les exons (à l'exception de l'exon 1) sont généralement pauvres en CpG [Figure 7]. Dans les cellules somatiques, la grande majorité de ces îlots sont dépourvus de méthylation permettant ainsi l'expression des gènes situés en aval (Illingworth and Bird, 2009).

Quand les séquences promotrices sont méthylées, cette méthylation est associée à une inhibition transcriptionnelle en agissant par encombrement stérique du grand sillon de l'hélice d'ADN. En effet, lorsqu'un promoteur possède un îlot CpG méthylé, deux mécanismes peuvent alors s'enclencher. D'un côté, des protéines peuvent reconnaître les CpG méthylés (Methyl-CpG-binding proteins, MBD comme MeCP2) et y recruter des co-répresseurs [Figure 7] (Meehan *et al.*, 1989; Meehan *et al.*, 1992; Nan *et al.*, 1998; Klose and Bird, 2006; Sassai and Defossez, 2009). De l'autre, ces groupements méthyles empêchent la reconnaissance par des facteurs de transcription, menant ainsi à la répression du gène sous le contrôle de ce promoteur (Watt and Molloy, 1988; Iguchi-Ariga and Schaffner, 1989 ; Prendergast and Ziff, 1991; Santoro and Grummt, 2001; Wiench *et al.*, 2011).

A l'inverse, un promoteur possédant un îlot CpG non méthylé, pourra aussi bien être associé à un gène activement transcrit ou soumis à d'autres formes de régulations (Meissner *et al.*, 2008). Certains îlots CpG sont quant à eux orphelins, c'est-à-dire qu'ils ne sont situés sur aucun promoteur de gène connu. Le rôle de ces îlots n'est pas encore totalement élucidé, mais ils sont généralement plus méthylés que leurs homologues situés sur des promoteurs et leur profil de méthylation semble suggérer un rôle tissu-spécifique (Illingworth *et al.*, 2008 ; Illingworth *et al.*, 2010).

Enfin, la méthylation dans le corps d'un gène apparaît liée à la transcription active dudit gène (Hellman and Chess, 2007; Aran *et al.*, 2011; Jjingo *et al.*, 2012) même si pour l'heure il n'est pas démontré clairement si c'est la méthylation qui induit l'expression ou l'inverse (Auclair and Weber, 2012). Nombres d'hypothèses sont émises, comme une participation dans l'épissage des pré-ARN messagers en agissant comme marqueurs des introns et exons. La méthylation intragénique pourrait également réprimer des promoteurs alternatifs de transcription.

La plupart des différences de méthylation de l'ADN entre 2 types cellulaires sont portées par **les rivages CpG** (Doi *et al.*, 2009 ; Irizarry *et al.*, 2009). Certaines données récentes tendent à montrer que ces derniers seraient impliqués dans l'utilisation de promoteurs alternatifs et que leur méthylation serait corrélée à une diminution de la transcription du gène voisin probablement en agissant comme site d'arrimage pour des MeCP, modifiant ainsi l'expression d'un gène, même s'il ne possède pas d'îlot CpG méthylé sur son promoteur (Stancheva *et al.*, 2003).

Dans le cas des **séquences répétées** de rétrotransposons ou de régions centromériques, la méthylation semblent favoriser une certaine stabilité chromosomique en empêchant la transcription de ces derniers (Bestor, 2005).

Enfin, grâce au développement de nouvelles techniques permettant l'analyse de la méthylation à l'échelle du génome, de nouvelles zones de méthylation en dehors des îlots CpG commencent à attirer l'attention, notamment **les bords des îlots CpG** (CpG island shelves, entre 2 et 4kb en 5' ou en 3' des îlots CpG) bien que leurs rôles exacts soient encore à déterminer (Song *et al.*, 2013).

3.1.2. Les méthyltransférases d'ADN (DNMT)

Le mécanisme de méthylation de l'ADN passe par des enzymes spécialisées : les méthyltransférases d'ADN ou DNMT.

i. Les DNMTs désignent une famille de protéines, conservées au cours de l'évolution, qui sont réparties chez les mammifères en DNMT1 et DNMT3 [Figure 8]. L'ancienne DNMT2 a été renommée méthyltransférase d'ARN de transfert (TRDMT1) puisque sa seule activité catalytique était sur l'ARN de transfert de l'acide aspartique et non sur l'ADN (Schaefer and Lyko, 2010 ; Squires *et al.*, 2012).

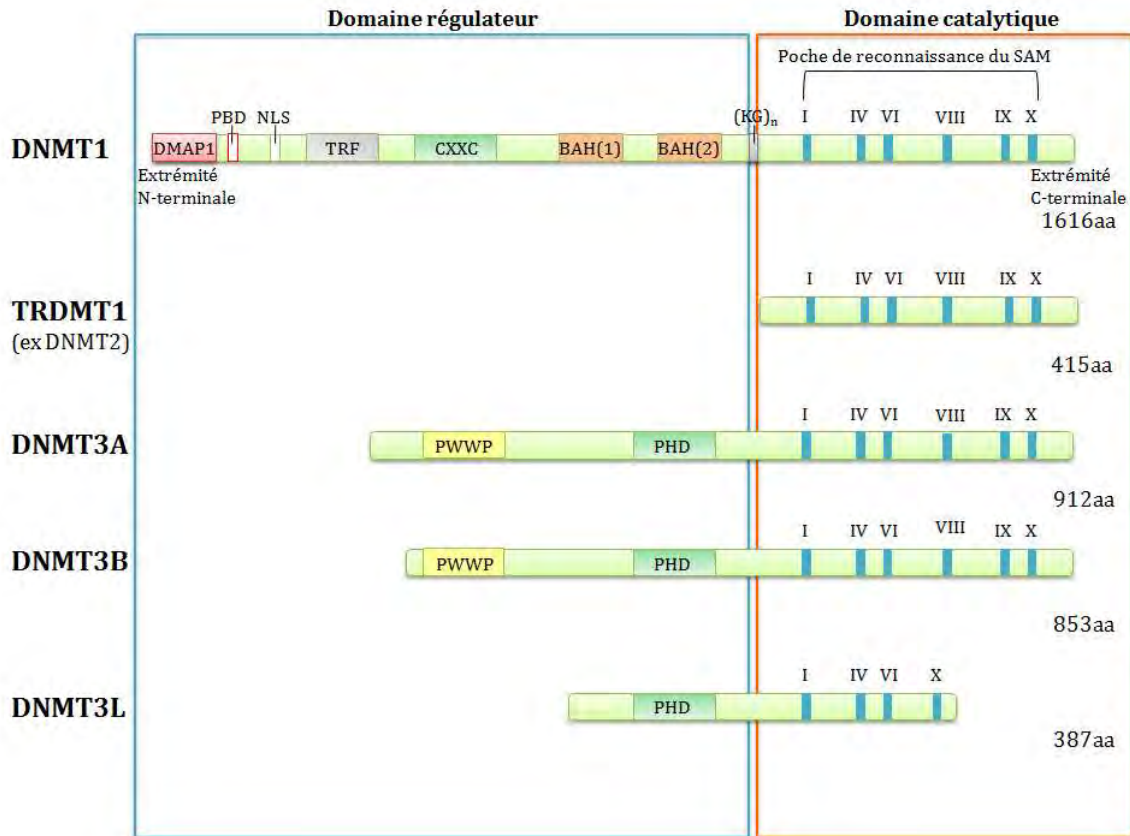


Figure 8. Structure des différentes DNMT humaines.

DMAP1 est le domaine d'interaction entre la DNMT1 et une protéine liée à la DNMT1 nommée elle-même DMAP1. PBD est le domaine d'interaction avec PCNA, NLS est le signal de localisation nucléaire, TRF le domaine ciblant les foyers de réplication, CXXC est le domaine d'interaction au Zn(II), BAH(1/2) sont des « Bromo-Adjacent Homology domains » et (KG)_n est un pont lysine-glycine entre le domaine régulateur et catalytique de la DNMT1. PWWP est le motif proline-tryptophane-tryptophane-proline et le PHD est le « Plant Homology Domain ». Figure tirée de (Gros *et al.*, 2012).

Les DNMT catalytiquement actives partagent des caractéristiques communes, notamment un domaine N-terminal régulateur et un domaine C-terminal catalytique [Figure 8]. Ce domaine catalytique est très conservé entre différentes espèces (Lauster *et al.*, 1989 ; Robertson, 2001 ; Jurkowska *et al.*, 2011) et présente dix motifs, permettant à la fois, la liaison du donneur de méthyle le *S*-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) et la reconnaissance de la cytosine ciblée. La partie N-terminale, quant à elle, permet une

localisation nucléaire de la protéine et semble aider au positionnement sur l'ADN en servant principalement de régulateur et de recruteur de protéines modulant la chromatine (Cheng and Blumenthal, 2010).

La **DNMT1** fut la première DNMT à être purifiée et caractérisée (Bestor and Ingram, 1983; Bestor, 1988; Bestor *et al.*, 1988) [Figure 9].

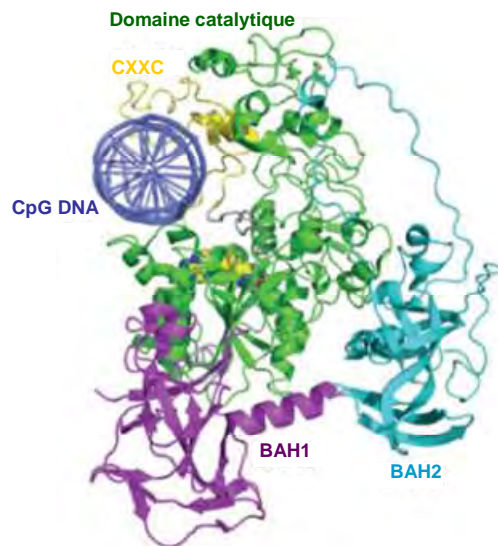


Figure 9. Représentation spatiale de la Dnmt1.

Représentation spatiale des acides aminés 650 à 1602 de la Dnmt1 murine en présence d'un duplex d'ADN de 19 pb contenant deux sites CpG non méthylés. L'ADN est coloré en bleu foncé et les domaines CXXC, BAH1, BAH2 et le domaine catalytique sont respectivement colorés en jaune, violet, bleu clair et vert. Figure tirée de (Song *et al.*, 2011). Code PDB: 3PT6.

De toutes les DNMT, cette enzyme est la plus abondante dans les cellules somatiques (Robertson *et al.*, 1999). Plusieurs observations *in vitro* montrent une préférence de la DNMT1 pour l'ADN hémiméthylé comparé au non-méthylé, avec une différence pouvant varier d'un facteur 2 à 40 (Pradhan *et al.*, 1997 ; Pradhan *et al.*, 1999 ; Goyal *et al.*, 2006 ; Jeltsch, 2006), ce qui a amené à décrire la DNMT1 comme une enzyme de **maintenances de la méthylation** qui aurait un grand rôle lors de la réplication cellulaire (Prokhortchouk and Defossez, 2008). La suppression du gène *Dnmt1* dans les souris peut mener à une importante déméthylation du génome et à une forte mortalité embryonnaire (Li *et al.*, 1992). Dans les cellules non-tumorales, la délétion conditionnelle ou totale de DNMT1 entraîne l'apoptose (Takashima *et al.*, 2009), de graves défauts mitotiques (Chen *et al.*, 2007) et peut favoriser la tumorigénèse par une forte instabilité chromosomique (Eden *et al.*, 2003 ; Gaudet *et al.*, 2003). Ces résultats montrent donc que DNMT1 est essentielle à la fois lors du développement

embryonnaire et dans les cellules somatiques, afin d'assurer la prolifération et la survie cellulaire (Jurkowska *et al.*, 2011).

La DNMT1 est une enzyme particulièrement complexe. En effet, si de nombreuses observations font état de sa préférence pour un substrat hémi-méthylé (Pradhan *et al.*, 1997 ; Pradhan *et al.*, 1999 ; Goyal *et al.*, 2006 ; Jeltsch, 2006), la DNMT1 possède deux sites de fixations de l'ADN : un site situé dans la poche catalytique et un site allostérique (Pradhan and Esteve, 2003a). Ainsi, selon le type d'ADN (non-méthylé, méthylé ou hémi-méthylé) lié à chacun des sites, la DNMT1 peut montrer des activités catalytiques bien différentes (Bacolla *et al.*, 1999 ; Svedruzic and Reich, 2005).

A l'opposé de la DNMT1, les **DNMT3A**, **DNMT3B** et **DNMT3L** sont présentes en plus faibles quantités dans les cellules somatiques et ont été découvertes un peu plus tardivement (Okano *et al.*, 1998a ; Bourc'h et al., 2001 ; Bourc'h and Bestor, 2004). La DNMT3L ne montre aucune activité catalytique seule (Deplus *et al.*, 2002 ; Margot *et al.*, 2003 ; Lan *et al.*, 2010) et semble servir de cofacteur de la DNMT3A. Elle interagit avec des modulateurs d'histones, jouant ainsi un rôle entre marques d'histones et méthylation d'ADN (Deplus *et al.*, 2002). Aucune préférence entre ADN hémiméthylé ou non-méthylé n'a été constatée pour les DNMT3A et 3B (Robertson *et al.*, 1999). Il a donc été proposé que les DNMT3A et 3B possèderaient un rôle lors de la mise en place de la méthylation sur des régions précédemment non méthylées, c'est-à-dire lors de la **méthylation de novo**. Plus précisément, DNMT3A a été identifiée comme principalement responsable de l'empreinte parentale des gènes, tandis que DNMT3B semble être souvent impliquée dans la méthylation des centromères étant donné que des mutations sur cette dernière entraînent, entre autres, une instabilité centromérique et des syndromes immunodéficients (Hansen *et al.*, 1999 ; Lan *et al.*, 2010 ; Jurkowska *et al.*, 2011).

TRDMT1 (anciennement DNMT2) a été identifiée par analogie avec la séquence ADN du domaine C-terminal de la DNMT1 (Wilkinson *et al.*, 1995). Son activité de méthyltransférase d'ADN est très limitée aussi bien *in vitro* que *in vivo*, suggérant que le domaine N-terminal des DNMT, absent sur TRDMT1 [Figure 8], n'est pas essentiel pour l'activité catalytique mais fonctionne plutôt comme un régulateur (Hermann *et al.*, 2004). Il a d'ailleurs été montré que le principal rôle de TRDMT1 n'est pas lié à la méthylation de l'ADN, mais à la méthylation de l'ARN de transfert de l'acide aspartique

(Goll *et al.*, 2006 ; Jurkowski *et al.*, 2008). A la grande différence des autres DNMT, une mutation voire même une invalidation par ARN interférence de *TRDMT1* n'induit pas de modification notable du phénotype (Okano *et al.*, 1998b ; Kunert *et al.*, 2003 ; Goll *et al.*, 2006).

ii. Les mécanismes de la méthylation de l'ADN

Le mécanisme général de méthylation de l'ADN est partagé par toutes les méthyltransférases d'ADN, indépendamment de l'espèce considérée (Bestor and Verdine, 1994). Il consiste à catalyser l'ajout, de manière covalente, d'un groupement méthyle (CH_3) en position 5 des cytosines à partir du cofacteur SAM [Figure 10].

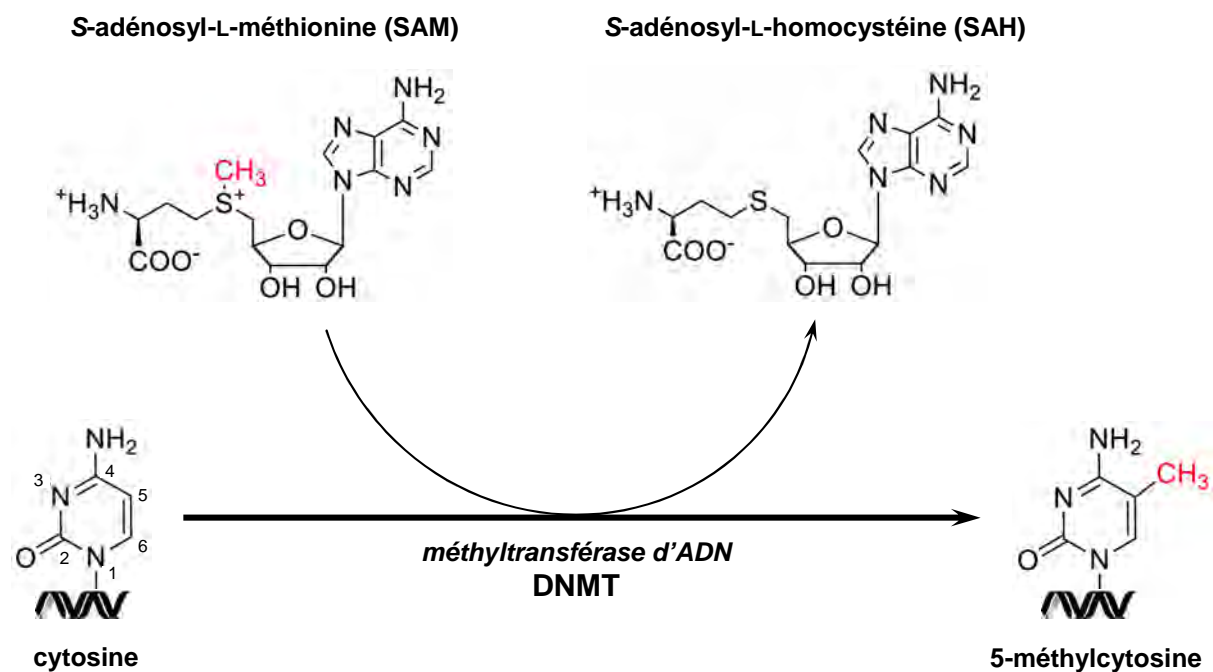


Figure 10. Mécanisme d'action des méthyltransférases d'ADN.

Les DNMTs méthylent l'ADN sur le carbone 5 des cytosines en utilisant le SAM comme donneur du groupement méthyle.

L'apposition de la méthylation de l'ADN peut se faire selon deux mécanismes : la maintenance ou la méthylation *de novo*. La **méthylation *de novo*** est principalement mise en place par les **DNMT3A et DNMT3B** grâce à des interactions avec des modifications chromatinienne ou avec des ARNnc pouvant servir de guides (Ooi *et al.*, 2007 ; Aravin *et al.*, 2008 ; Holz-Schietinger and Reich, 2012). Ces deux DNMT sont les seules possédant un domaine proline-tryptophane-tryptophane-proline (PWWP) qui leur permet de se lier directement à l'ADN (Ge *et al.*, 2004). De plus, la DNMT3L permet de former un tétramère DNMT3L-3A-3A-3L [Figure 11], suggérant la méthylation

simultanée de deux sites CpG espacés par un tour d'hélice (Jia *et al.*, 2007). Ce tétramère peut d'ailleurs s'oligomériser directement sur l'ADN et méthyler ainsi beaucoup plus de sites CpG (Jurkowska *et al.*, 2008).



Figure 11. Représentation spatiale du complexe Dnmt3A/Dnmt3L.

Modélisation de l'organisation spatiale des domaines catalytique du tétramère Dnmt3A-Dnmt3L en présence d'une molécule d'ADN d'environ 25 pb. Figure tirée de (Jia *et al.*, 2007). Code PDB: 2QRV.

La **maintenance de la méthylation** est par contre réalisée majoritairement par la **DNMT1** selon deux mécanismes différents. Au début de la phase S du cycle cellulaire, la DNMT1 est transportée dans le noyau grâce à son domaine de signal de localisation nucléaire (NLS) et plus précisément au foyer de réplication à l'aide d'une séquence localisée dans son domaine N-terminal (« targeted replication foci » ou TRF) et de son domaine d'interaction avec PCNA (PBD) [Figure 8]. La DNMT1 va alors se lier à l'ADN hémiméthylé et compléter la méthylation sur le brin nouvellement synthétisé (Iida *et al.*, 2002 ; Prokhortchouk and Defossez, 2008 ; Lan *et al.*, 2010). Une fois cette méthylation effectuée, la DNMT1 pourra avancer le long du nouveau brin d'ADN et vérifier les éventuelles erreurs dans la maintenance de cette marque épigénétique. Le second mécanisme est basé sur UHRF1, une protéine reconnaissant l'ADN hémiméthylé, pouvant recruter la DNMT1 et ainsi la positionner sur les sites à méthyler, notamment grâce à une reconnaissance des sites hémi-méthylés et de la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me) (Cheng and Blumenthal, 2010 ; Bianchi and Zangi, 2013 ; Liu *et al.*, 2013).

De plus, les DNMT peuvent interagir entre elles. Par exemple, la partie N-terminale de la DNMT1 peut se lier aux parties N-terminales de la DNMT3A et DNMT3B, permettant ainsi à la DNMT1 de participer à la méthylation *de novo* (Fatemi *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2002). De la même façon, les DNMT3s peuvent avoir une activité de

maintenance de la méthylation lorsque la DNMT1 est absente ou non (Xu *et al.*, 2010 ; Walton *et al.*, 2011). La séparation entre méthylation *de novo* et maintenance n'est donc pas stricte.

Grâce à tous ces mécanismes, la maintenance de la méthylation de l'ADN est réalisée avec une fréquence d'erreurs de l'ordre de 5% par site CpG et par division cellulaire (Riggs *et al.*, 1998), permettant aux cellules une certaine flexibilité pour des changements subtils mais probablement importants dans leurs profils de méthylation.

3.1.3. La déméthylation de l'ADN

L'existence d'une déméthylation active de l'ADN, directement impliquée dans la régulation épigénétique, a longtemps fait débat (Bhutani *et al.*, 2011). La déméthylation a longtemps été considérée comme un phénomène essentiellement passif lors de la réplication, ou issu de la réparation de l'ADN par hydrolyse de la 5-méthyl-2'-désoxycytidine en 2'-désoxythymidine. Cette conversion spontanée est décrite et contribue à expliquer la sous-représentation des CpG dans le génome (Schorderet *et al.*, 1992). Pourtant l'existence d'un mécanisme rapide et actif de déméthylation est suspecté depuis les années 70 et en 1990 une déméthylation rapide et active a été clairement démontrée, sans que le mécanisme soit défini (Paroush *et al.*, 1990). En 2009, deux équipes ont mis en évidence la présence de la 5-hydroxyméthyl-2'-désoxycytidine (5-hmdC) dans certaines cellules neuronales et les enzymes responsables de la conversion de la 5-mdC en 5-hmdC suggérant un nouveau mécanisme de déméthylation active (Kriaucionis *et al.*, 2009 ; Tahiliani *et al.*, 2009). Les enzymes TET 1, 2 et 3 (Ten-Eleven Translocation enzymes) sont les enzymes responsables de l'oxydation de la 5-méthyl-2'-désoxycytidine en 5-hydroxyméthyl-2'-désoxycytosine (5-hmdC) (Franchini *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été montré qu'elles participent ensuite à la transformation de la 5-hmdC en 5-formyl-2'-désoxycytidine puis en 5-carboxy-2'-désoxycytidine, substrats pouvant être remplacés par une cytosine par des enzymes du mécanisme de réparation de l'ADN "Base Excision Repair" (BER). Il a également été démontré que le noyau cytosine peut être désaminé *via* l'action de cytidines désaminases pour former une thymine. La modification de la base méthylcytosine en thymine crée un mésappariement (T / G) dans la séquence ADN qui est reconnu et «réparé» et la thymine incriminée est alors remplacée par une cytosine afin de restaurer l'hybridation du double brin d'ADN (Bhutani *et al.*, 2010).

Des études ont montré que TET1 interagit préférentiellement avec les régions riches en CpG dans les promoteurs ou dans le corps des gènes, probablement par l'intermédiaire de son domaine CXXC. De plus, les gènes auxquels sont liés TET1 peuvent être actifs et inactifs suivant leur nature puisque la déplétion de TET1 provoque soit une diminution de la transcription soit une augmentation (Xu *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011 ; Ficiz *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011). Cette enzyme joue donc des rôles multiples dans la régulation de l'expression génique. La découverte de fréquentes mutations de TET2 dans de nombreuses leucémies en font aujourd'hui une protéine d'intérêt majeur dans le domaine de l'épigénétique (Chan *et al.*, 2013). Toutes ces données suggèrent ainsi, un lien entre l'oxydation des 5mC par les protéines TETs et la déméthylation.

L'équilibre entre méthylation et déméthylation de l'ADN apparaît donc aujourd'hui comme un composant précis et pouvant être conservé dans la régulation épigénétique.

3.2. Les modifications post-traductionnelles des histones

La méthylation de l'ADN est liée à une autre marque épigénétique majeure : la modification chimique des queues N-terminales des histones. Les histones sont des protéines de faible poids moléculaire, riches en acides aminés basiques et elles s'organisent en octamère comprenant deux exemplaires de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Autour de chaque octamère s'enroule 147 pb d'ADN chargé négativement, l'ensemble forme le nucléosome (Luger *et al.*, 1997). Enfin, l'histone H1 sert de liaison afin de sceller le nucléosome. Les histones sont constituées de deux parties structurellement bien distinctes, le corps des histones et la « queue des histones ». [Figure 12]. Ces protéines ont un rôle structural car elles permettent de compacter les 6,4 milliards de pb de l'ADN humain mais ce sont aussi des entités dynamiques qui régulent l'expression des gènes en agissant sur le degré de compaction de la chromatine [Figure 2 et Figure 3].

3.2.1. Une marque épigénétique complexe

La partie que l'on nomme « queue des histones » est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles [Figure 13]: acétylation, méthylation, phosphorylation, SUMOylation, ubiquitination, clivage de la queue (Bannister and Kouzarides, 2011). Ces modifications sont mises en place par des protéines spécialisées



Diagram illustrating the four major histone proteins (H2A, H2B, H3, and H4) and their associated modifications. Each protein is shown as a linear sequence of amino acids with specific modifications marked by colored circles: green for acetylation (ac), blue for methylation (me), red for phosphorylation (ph), and purple for ubiquitylation (ub1).

H2A: N-SGRGKQGCKARAK...H2A...KTESHHKAKGK...C. Modifications: ph (1), ac (5), ac (9), ac (13), ub1 (119), ph (120).

H2B: N-PEPAKS...KGSKK...KA...H2B...KAVTKYTSSK...C. Modifications: ac (5), ac (12), ph (14), ac (15), ac (20), ub1 (120).

H3: N-ARTK...RKST...K...RK...K...RKS...K...H3...K...K...C. Modifications: me (2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 18, 23, 26, 27, 28, 36), ac (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36), ph (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36), ac (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36).

H4: N-SGRGKGGKGLGKGGAKRRHKV...H4...C. Modifications: ph (1), me (3), ac (5), ac (8), ac (12), ac (16), ac (18), me (20).

Legend:

- ac: Acetylation
- me: Méthylation
- ph: Phosphorylation
- ub1: Ubiquitylation

Représentation schématique de la localisation et de la nature des principales modifications post-traductionnelles des queues d'histones. Figure adaptée de (Spivakov and Fisher, 2007).

Généralement, l'acétylation des lysines (catalysée par les HAT), est associée à un état chromatinien permissif pour la transcription (Hebbes *et al.*, 1988). La neutralisation de la charge positive du groupement NH_3^+ de la lysine permet de relâcher l'interaction ADN-histones et induit la décompaction de la chromatine. La méthylation des histones est, elle, plus complexe et dépend du type de résidu (K ou R) qui est méthylé, de la position de celui-ci (K4, K9, K27...) et du nombre de méthyles (1, 2 ou 3) apposés par les HMT [Tableau 1].

Marque d'histones	Enzyme "writer"	Etat transcriptionnel	Rôle / Localisation
H3K4 (me2-3)	MLL (1 à 4), SETD1 A/B	Actif	Promoteur riche en CpG, gènes activés par les protéines Trithorax
H3K9 (me2-3)	G9a, SUV39H, SETDB 1	Répressif	Hétérochromatine (centromère, séquences répétées, transposons)
H3K27 me3	EZH1/2	Répressif	Promoteur des gènes réprimés par les protéines Polycomb (PRC2)
H3K36 me3	SETD2, NSD1-3, SYMD2	Actif	Corps des gènes, lié à l'élongation
H4K16 Ac	MOF, MORF, MOZ, TIP60	Actif	Gènes
H4K20 me3	SUV420H	Répressif	Hétérochromatine, réparation de l'ADN
H2AK119 Ub	BMI1	Répressif	Promoteur des gènes réprimés par les protéines Polycomb (PRC1)

Tableau 1. Fonctions des modifications post-traductionnelles des histones.

Les modifications post-traductionnelles des histones sont nombreuses. Il existe au moins 11 modifications chimiques différentes intervenant sur plus de 60 résidus présents sur les queues N-terminales des histones. Ce tableau représente une liste non exhaustive des enzymes impliquées dans l'apposition de ces marques, l'état transcriptionnel associé et le rôle ou la localisation de ces marques.

3.2.2. De nombreux acteurs

A la complexité des modifications post-traductionnelles des histones, que l'on nomme parfois « code histone », s'ajoute donc celle des nombreux acteurs qui interviennent pour apposer ou éliminer ces marques. On parle de protéines « **Writers** »

et de protéines « **Erasers** ». Les protéines, capables de reconnaître puis se fixer aux histones (ou à l'ADN) modifiés et de recruter des complexes de machinerie d'activation ou de répression de la transcription, sont à leur tour caractérisées comme des éléments « **readers** » de l'épigénome [Tableau 2].

Epigenetic Mechanism	"Writer" Enzymes	"Eraser" Enzymes	"Reader" Domains
Histone Acetylation	Histone Acetyltransferases HAT (3 families) : -GCN5/PCAF -MYST -P300/CBP	Histone Deacetylases HDAC	-Bromodomains -Pleckstrin Homology Domains (PHD) -Tandem PHD Fingers
Histone Arginine Methylation	Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs)	Histone Demethylases JMJD6	-Tudor Domains (recognize symmetrically dimethylated arginines) -WD40 Domains
Histone Lysine Methylation	Histone Lysine Methyltransferases KMT (4 families): -SUV3 -SET1 -SET2 -RIZ	Histone Lysine Demethylases : KDMs/LSD1 JMJDs	-Chromodomains -Tudor Domains -PHD Fingers -MBT Domains -WD40 Domains -PWWP
Histone Phosphorylation	Kinases (JAK2, ATM/ATR, PKC, PKA, Aurora B Kinase, AMPK, MEK)	-Serine/Threonine Phosphatases -Tyrosine Phosphatases	-Chromoshadow Domains (phosphoTyrosine) -14.3.3 Proteins (phosphoSerine) -BIR Domains -BRCT Proteins
Histone Ubiquitination	-Ubiquitin E2 Conjugases -Ubiquitin E3 Ligases	Deubiquitinating Enzymes	Unknown
DNA Methylation	DNA Methyltransferases (DNMT)	-Active DNA Demethylation : TET enzymes -Passive DNA Demethylation	Methyl-CpG Binding Domains : -MBD domains -SRA domains -Zinc fingers

Tableau 2. Les acteurs du paysage épigénétique.

Ce tableau représente une liste des acteurs majeurs impliqués dans les modifications et la lecture du paysage épigénétique. Tableau mis en forme à partir de (Kuo *et al.*, 1998; Jenuwein, and Allis, 2001; Schneider *et al.*, 2004; Martin and Zhang, 2005; Shi, 2007; Di Lorenzo and Bedford, 2011; Arrowsmith *et al.*, 2012; Barbieri *et al.*, 2013; Roidel and Hacker, 2014).

3.3. Le positionnement des nucléosomes

La densité en nucléosomes présente sur un locus donné a un impact important sur son expression par la régulation de son accessibilité. En effet, la compaction de la chromatine, due à la présence de nucléosomes sur des promoteurs de gènes, va empêcher la fixation des facteurs de transcription. Il a été montré que la perte d'un nucléosome en amont du site de démarrage de transcription est étroitement liée à l'activation du gène (Lin *et al.*, 2007 ; Shivaswamy *et al.*, 2008).

De manière générale, la cartographie génomique du positionnement des nucléosomes a révélé la présence de **régions dépourvues de nucléosomes** ou **NFR** (Nucleosome Free Region), en amont des sites d'initiation de la transcription (TSS) de gènes actifs (Schones *et al.*, 2008 ; Jiang and Pugh, 2009). Les sites de fixation des facteurs de transcription sont habituellement localisés dans ces régions. Ces NFR semblent servir de sites d'assemblage et de désassemblage de la machinerie transcriptionnelle (Figure 14) (Yuan *et al.*, 2005).

Les changements dynamiques du positionnement des nucléosomes sont régulés par plusieurs facteurs : la séquence de l'ADN, les complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP et les facteurs de transcription (dont le complexe de pré-initiation et l'ARN Pol II) (Smith and Peterson, 2005 ; Struhl and Segal, 2013).

Les NFR localisées au niveau des TSS sont généralement entourées de deux nucléosomes bien positionnés en amont et en aval (-1 et +1) [Figure 14]. Le premier nucléosome en amont du TSS est sujet à de nombreuses variations durant la transcription. Ces variations affectent sa stabilité : acétylation, méthylation, repositionnement et éviction après la formation du complexe de pré-initiation (Jiang and Pugh, 2009). En aval du TSS, le premier nucléosome contient souvent des variants d'histones H2A.Z et H3.3 (Bargaj *et al.*, 2012 ; Biterge and Schneider, 2014). Ces variants d'histones forment des nucléosomes moins stables, facilitant ainsi leur éjection et l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle. Pendant la transcription, ce nucléosome est probablement expulsé, mais semble reprendre sa place une fois que l'ARN Pol II est passée (Jiang and Pugh, 2009).

Les nucléosomes sont de moins en moins en phase lorsque l'on s'éloigne du TSS. Enfin, il existe une deuxième NFR à l'extrémité 3' du gène (Jiang and Pugh, 2009) [Figure 14].

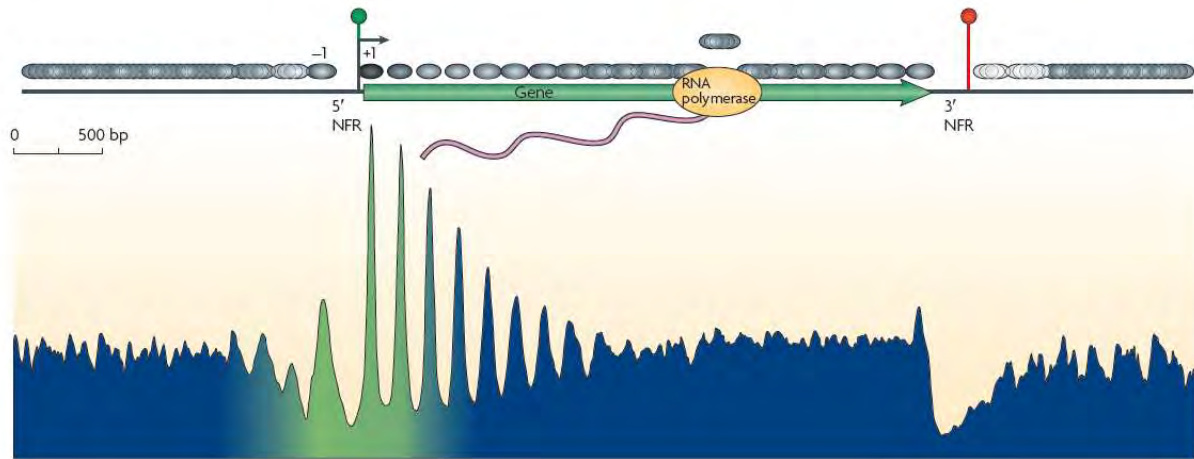


Figure 14. Positionnement des nucléosomes sur un gène.

Des régions dépourvues de nucléosomes (NFR) sont présentes en amont du TSS et en aval du gène. Les nucléosomes autour du TSS sont bien positionnés et le deviennent de moins en moins en s'en éloignant. Figure tirée de (Jiang and Pugh, 2009).

3.4. Les ARN non codants

On sait aujourd'hui que les 98% du génome correspondant aux régions non codantes du génome sont activement transcrits pour former de nombreux ARNnc : sens, antisens, intergéniques ou recouvrant des gènes (Carninci *et al.*, 2005 ; Mattick and Makunin, 2006).

Beaucoup de ces **ARNnc** sont des transcrits **antisens** de plusieurs centaines de bases. Ils peuvent être générés en amont du TSS d'un ARN codant et le recouvrir en partie. Des études ont ainsi montré que plus de 70% des transcrits ont un partenaire antisens chez l'homme et la souris (Beiter *et al.*, 2009 ; Katayama *et al.*, 2005).

Il n'existe pas un mécanisme d'action canonique de ces ARNnc mais de nombreux modèles ont été avancés comme par exemple une possible interaction avec le complexe répressif PRC2 (Khalil *et al.* 2009), une interférence transcriptionnelle (Martens *et al.* 2004 ; Hongay *et al.* 2006 ; Petruk *et al.* 2006), ou encore une interférence de l'élongation par association avec des polymérases d'ARN (Espinoza *et al.* 2004 ; Mariner *et al.* 2008 ; Faghihi and Wahlestedt, 2009 ; Caley *et al.* 2010).

3.4.1. Les petits ARN non codants

A l'opposé des longs ARNnc, les **petits ARNnc** sont scindés en trois groupes : les **micro-ARN** (ARNmi), les **petits ARN interférants** (ARNsi) et les **ARN interagissant avec Piwi**, une sous-famille des protéines Argonautes (ARNpi). Pour ces derniers, il a été

montré que les complexes - PIWI / ARNpi - pouvaient recruter des modificateurs épigénétiques sur les séquences complémentaires des ARNpi, le plus souvent des transposons et des séquences répétées (Aravin *et al.* 2008 ; Kuramochi-Miyagawa *et al.* 2008 ; Huang *et al.* 2013). Les ARNmi et ARNsi sont, quant à eux, plus petits (environ 22 pb) que les ARNpi et participent à la régulation post-transcriptionnelle des gènes en s'appariant à la région 3' non traduite de l'ARN messager (ARNm) ciblé. Ils entraînent ainsi la formation d'un complexe répressif et la dégradation de cet ARNm (He and Hannon 2004). Ce mécanisme est loin d'être canonique et on peut également observer un phénomène d'inhibition de la traduction (Gu and Kay 2010) ou un recrutement de modulateurs épigénétiques sur la séquence ciblée par ces ARNsi ou ARNmi (Mette *et al.* 2000 ; Aufsatz *et al.* 2002).

Il existe plus d'un millier de miRNA chez l'homme, ils sont exprimés de manière tissu spécifique et contrôlent *via* leurs cibles des processus fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Choudhuri *et al.*, 2011).

La diversité des ARNnc et de leurs mécanismes d'action en fait des régulateurs épigénétiques particulièrement intéressants mais complexes.

3.4.2. Lien entre ARNnc et méthylation de l'ADN

Chez les plantes, les petits ARN et la machinerie de l'ARN interférence sont impliquées dans le processus de RNA-dependant DNA methylation (RdDM) qui dirige spécifiquement la méthylation de l'ADN sur des éléments transposables et les séquences répétées du génome (Henderson and Jacobsen, 2007 ; Wassenegger *et al.*, 1994). Chez les mammifères, l'existence de ce processus de RdDM n'a pas été démontré, néanmoins, les enzymes Dicer et Argonaute de la machinerie de l'ARN interférence semblent être importante pour la formation des zones d'hétérochromatine. Les centromères sont transcrits et donnent naissance à des siRNA essentiels à leur propre répression épigénétique par méthylation des histones et de l'ADN (Djupedal and Ekwall, 2009). Par ailleurs, les petits ARN piRNA jouent un rôle essentiel dans la mise en place de la méthylation des éléments transposables des cellules germinales mâles au cours de l'embryogénèse. Ces piRNA, s'associent aux régions cibles grâce aux PIWI, enzymes de la famille Argonaute. Suite à la modification locale des marques d'histones, DNMT3A et DNMT3L sont recrutées et induisent la méthylation de ces séquences instables du

génomique. Ce processus est indispensable à la formation des gamètes mâles (He *et al.*, 2011).

Longs ou courts, les ARNnc ont un rôle essentiel dans la régulation de régions codantes et non codantes du génome, sans modifier la séquence d'ADN. Ils font partie intégrante du paysage épigénétique.

4. Des mécanismes coopératifs

En plus de leurs rôles respectifs, toutes les différentes marques épigénétiques, présentées dans ce premier chapitre, interagissent entre elles. Cela crée une infinité de paysages épigénétiques différents et extrêmement dynamiques dans le but de réguler finement l'expression des gènes, l'organisation de la chromatine et l'identité cellulaire (Cedar and Bergman, 2009) [Figure 15].

De nombreuses observations ont établi un lien très étroit entre les modifications covalentes des histones et celles de l'ADN. En effet, certaines HMT, comme G9A, SUV39H1 ou PRMT5, peuvent recruter des DNMT sur des séquences génomiques particulières (Lehnertz *et al.* 2003 ; Tachibana *et al.* 2008 ; Zhao *et al.* 2009). A l'inverse, les CpG méthylés peuvent être reconnus par des protéines se liant à l'ADN méthylé (par exemple des MBD ou MeCP2) qui, à leur tour, vont recruter des protéines modificateuses des histones (HDAC ou HMT), créant ainsi un environnement répressif particulièrement stable (Espada and Esteller 2007 ; Clouaire and Stancheva 2008 ; Bogdanovic and Veenstra 2009 ; Espada and Esteller 2010).

Les régions « enhancer » actives, qui régulent la transcription de gènes parfois situés à plusieurs kb, ont un profil épigénétique caractérisé par l'absence de méthylation de l'ADN, la présence du variant d'histone H2A.Z et de la marque H3K4me1 en plus d'une NFR (Taberlay *et al.*, 2011) [Figure 15]. Le positionnement des nucléosomes est ainsi étroitement lié au statut de méthylation de l'ADN et à la présence de variants et de modifications d'histones.

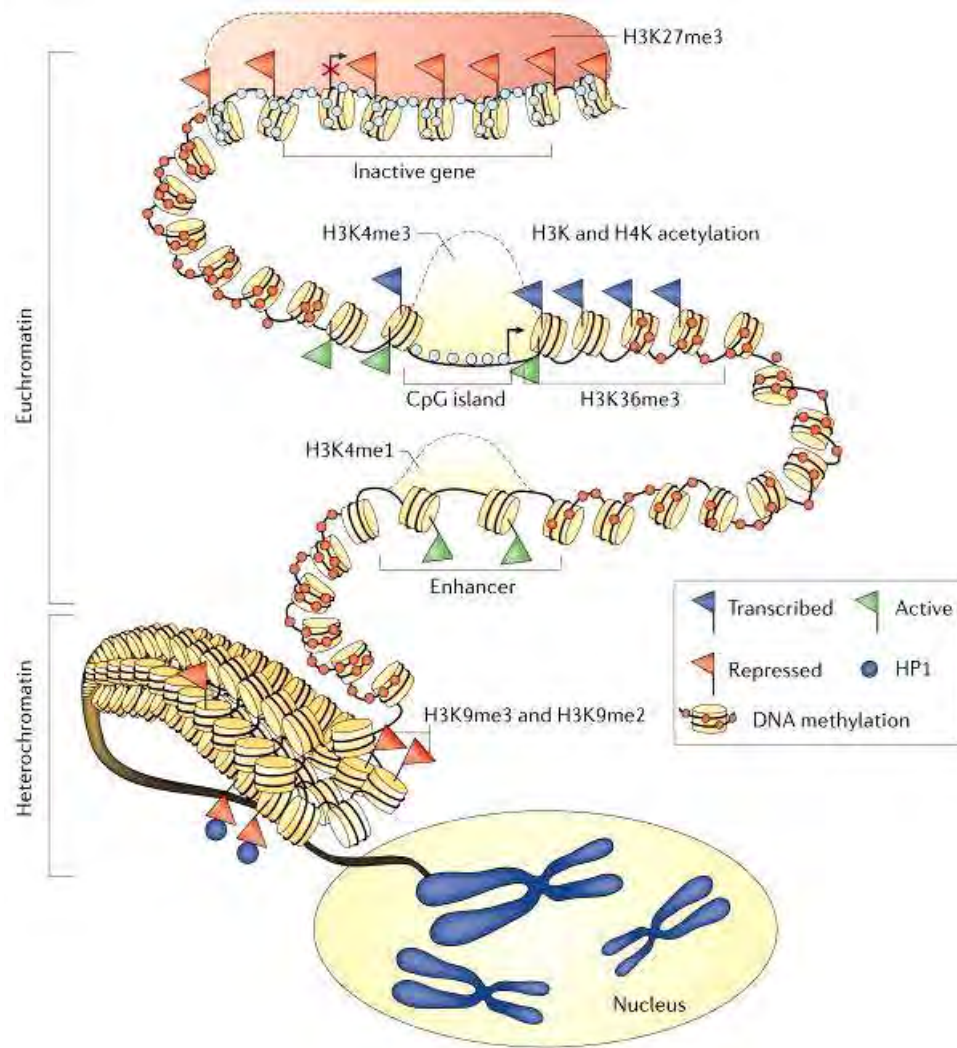


Figure 15. Epigénome et organisation chromatinienne.

Méthylation de l'ADN, modifications d'histones et positionnement des nucléosomes sont représentés sur ce schéma dans différents contextes chromatinien. En haut de la figure, un gène est réprimé (indiqué par un X rouge) par le système Polycomb (zone ombragée en rouge) situé sur une région dense en nucléosomes. L'ADN n'est pas méthylé et caractérisée par la présence de marques répressives H3K27me3. L'ADN est, par contre, fortement méthylé (cercles rouges) en amont du promoteur. Un peu plus bas, le promoteur d'un gène transcrit (indiqué par une flèche) est illustré par l'absence de méthylation de l'ADN et la présence de marques activatrices H3K4me3 mais également l'acétylation de H3 et H4. De plus, la région d'initiation de la transcription n'est pas occupée par des nucléosomes et le corps du gène situé en aval est marqué par la présence de H3K36me3 qui facilite l'élongation. Juste au-dessous, une séquence Enhancer est disponible pour ce gène avec une configuration ouverte des nucléosomes, et la présence de H3K4me1. Enfin, en bas de la figure, on retrouve une méthylation de l'ADN, la protéine de l'hétérochromatine 1 (HP1), la présence des marques répressives H3K9me2 et H2K9me3, associées à la compaction de l'ADN en hétérochromatine. Figure tirée de (Baylin and Jones, 2011).

Chapitre 2 – L'épigénétique dans le cancer

Malgré les nombreux contrôles instaurés par la cellule, la complexité de la machinerie de transcription des gènes est parfois fragile. De nombreux syndromes sont liés à une dérégulation du contrôle du génome (génétique et / ou épigénétique) qui a pour conséquence une expression ou une répression aberrante de certains gènes. Parmi ces maladies, le cancer est une manifestation du dysfonctionnement cellulaire largement répandue et étudiée.

1. Le cancer

1.1. Une maladie mondiale

Le cancer figure parmi les principales causes de mortalité dans le monde : l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, www.who.int/fr/) et l'International Agency for Research on Cancer (IARC, www.iarc.fr/) évaluent en 2012, à approximativement 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie (World Cancer Report 2014, IARC). Ces deux organisations estiment que le nombre de cas de cancer annuel devrait augmenter à 22 millions au cours des deux prochaines décennies.

Chez les hommes, les 5 types de cancer les plus couramment diagnostiqués en 2012 touchaient les poumons, la prostate, le côlon, l'estomac et le foie, tandis que chez les femmes, ils concernaient les seins, le côlon, le col de l'utérus et l'estomac.

Environ 30% des décès par cancer sont dus aux cinq principaux facteurs de risque comportementaux et alimentaires: un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool. Le tabagisme est le facteur de risque le plus important, entraînant dans le monde environ 20% de la mortalité par cancer et près de 70% des décès par cancer du poumon. Dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, on impute jusqu'à 20% des décès par cancer à des infections virales, notamment par le virus de l'hépatite B et C ou le papillomavirus humain (HPV).

Contrairement à certaines idées reçues, les pays les plus touchés par le cancer ne sont pas forcément les pays développés. En effet, plus de 60% des nouveaux cas de cancer

surviennent en Afrique, Asie, Amérique centrale et Amérique latine. Ces régions représentant 70% des décès par cancer dans le monde.

La situation mondiale est telle que l'OMS a récemment lancé un plan d'action 2013-2020 afin de lutter contre les maladies non-transmissibles dont le cancer, notamment en encourageant la recherche fondamentale et thérapeutique.

En effet, pour soigner cette maladie, il faut d'abord essayer de comprendre **quelles sont les caractéristiques des cellules cancéreuses ? Comment apparaissent-elles ?** Et surtout, **comment combattre leur prolifération ?**

1.2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses

Les tumeurs sont définies comme un amas cellulaire entraînant le gonflement d'un organe ou d'un tissu, et peuvent être bénignes ou malignes. Dans le cas des tumeurs malignes, ces cellules acquièrent une forte capacité d'invasion des tissus adjacents et se divisent rapidement de façon incontrôlée, c'est alors que l'on parle de cancer. On distingue différents types de cancer suivant les tissus concernés :

- Les tumeurs « solides » : les **carcinomes** qui se développent à partir de tissus épithéliaux (peau, muqueuse...), les **sarcomes** qui atteignent les tissus conjonctifs comme les tissus adipeux, les tissus musculaires ou les vaisseaux, et les **gliomes** qui envahissent le cerveau.
- Les cancers « liquides » : les **lymphomes** qui atteignent les lymphocytes et tout le système lymphatique (ganglions, rate, foie...) et les **cancers hématopoïétiques** ou leucémies, qui s'attaquent aux cellules sanguines et à la moelle osseuse.

Cependant, les tumeurs sont bien plus qu'une masse isolée de cellules cancéreuses en prolifération. Ce sont des organes complexes constitués de différents types cellulaires, cancéreux ou non, qui décrivent un véritable microenvironnement tumoral et participent au développement du cancer (Hanahan and Coussens, 2012).

En effet, on peut retrouver dans des tumeurs, des cellules endothéliales composant de nouveaux vaisseaux sanguins destinés à l'irrigation de la tumeur, ainsi que des cellules immunitaires et inflammatoires (Hanahan and Coussens, 2012). De plus, cette hétérogénéité s'étend même au sein des cellules dites cancéreuses où des « cellules souches cancéreuses » se distinguent d'autres cellules tumorales par leur capacité à reformer des tumeurs après inoculation dans un organisme hôte (Weinberg, 2006).

Hanahan et Weinberg ont établi 10 critères qui permettent l'identification des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000 et 2011) [Figure 16]:

- Une reprogrammation du métabolisme énergétique,
- Une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération,
- Une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs,
- Une résistance au système immunitaire,
- Un potentiel réplcatif illimité,
- Un pouvoir inflammatoire permettant la progression tumorale,
- Une capacité d'invasion tissulaire et la formation de métastases,
- Un développement de l'angiogénèse
- Une instabilité génomique
- Un échappement à l'apoptose

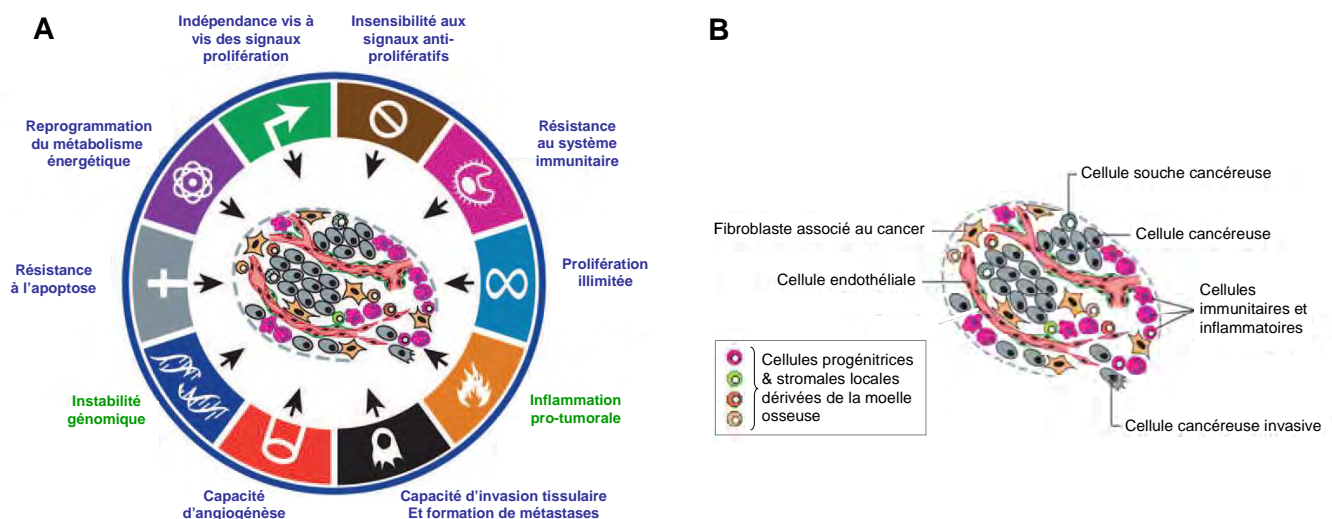


Figure 16. Caractéristiques des cellules cancéreuses et complexité d'une tumeur.

A. Les caractéristiques des cellules tumorales. **B.** Une tumeur est constituée à la fois de cellules cancéreuses hétérogènes (cellules invasives, cellules souches cancéreuses...) et de tissus non cancéreux (fibroblastes, cellules immunitaires et inflammatoires, cellules endothéliales...). Figure tirée de (Hanahan and Weinberg 2011).

Mais comment une cellule saine acquiert-elle ces caractéristiques ?

1.3. D'une cellule saine à une cellule cancéreuse

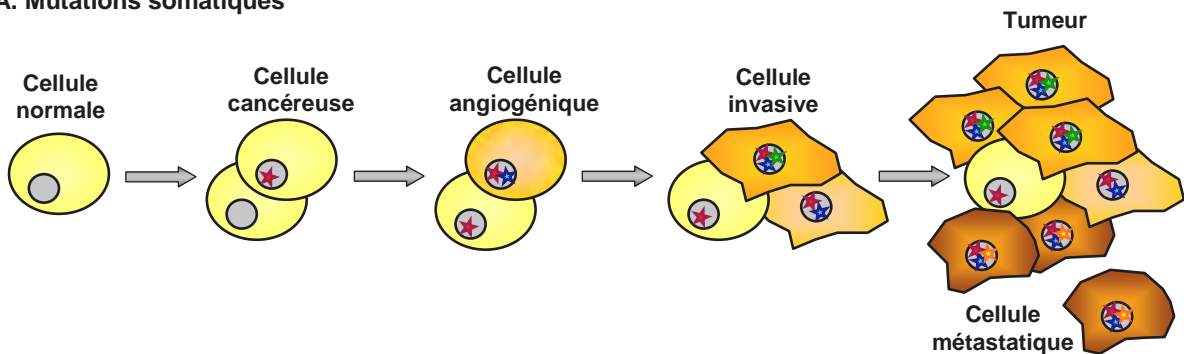
La recherche s'est longtemps focalisée sur les causes génétiques du cancer. Cela remonte au début du XX^{ème} siècle, où les premières observations microscopiques de cellules tumorales ont révélé des aberrations chromosomiques. Plus tard, l'identification d'anomalies génomiques spécifiques telle que la translocation t(9;22) formant le chromosome de Philadelphie dans la leucémie myéloïde chronique (Nowel and Hungerford, 1960 ; Rowley, 1973), puis la description de la première mutation somatique de l'oncogène *HRAS* (Reddy *et al.*, 1982) ont marqué un tournant dans la recherche sur le cancer. Il en découla d'intenses études moléculaires sur la génétique du cancer, donnant aujourd'hui une vaste liste d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) connus pour avoir un rôle dans la tumorigénèse.

La théorie des mutations somatiques suppose ainsi que les cancers débutent par une accumulation de mutations aléatoires, puis par une instabilité génomique probablement due à une défaillance du système de réparation et une réplication de l'ADN non fidèle (Lengauer *et al.* 1998 ; Cahill *et al.* 1999). Ces mutations engendrent alors une population de cellules hétérogènes qui subissent une pression sélective de leur micro environnement pour finalement conduire à la sélection des phénotypes les plus aptes à survivre et à proliférer, c'est-à-dire ceux présentant les critères de Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011).

Cette théorie a cependant ses limites car, en effet, comment expliquer que certaines tumeurs puissent « régresser » d'un stade malin à un stade bénin, étant donné que les mutations sont des phénomènes irréversibles (Bergstein, 2003) ? De plus, lors du développement embryonnaire ou même pendant la différenciation, de nombreux changements rapides dans le phénotype cellulaire ont lieu, sans pour autant avoir recours à cette théorie des mutations somatiques. L'évolution d'une cellule souche d'embryon se rapproche en ce sens de l'évolution des cellules cancéreuses (Tu, 2013) : toutes deux sont des cellules en division rapide, toutes deux subissent des changements drastiques dans leurs phénotypes et toutes deux transmettent ces changements à leurs descendances. Par bien des aspects, la tumorigénèse s'apparente donc à l'embryogénèse et c'est précisément l'étude du développement embryonnaire et ses avancées qui ont

permis de mieux comprendre le cancer en y ajoutant le concept d'épigénétique (Jones and Baylin, 2007).

A. Mutations somatiques



B. Différentiation cellulaire (Génome inchangé mais modification de l'expression des gènes)

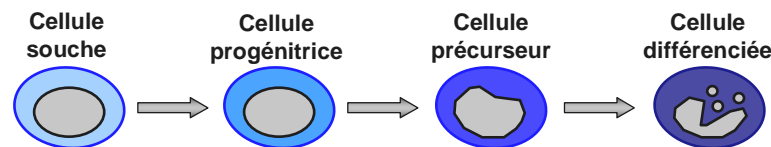


Figure 17. Le paradoxe de la théorie des mutations somatiques.

A. Les changements phénotypiques d'une cellule saine vers une cellule tumorale sont expliqués par des mutations somatiques et une pression de sélection. **B.** Néanmoins la différenciation, qui induit des changements phénotypiques plus drastiques, voit son génome inchangé. Figure adaptée de (Huang, 2012).

Il a été montré que les cellules cancéreuses présentent une altération de leur épigénome avec un impact important dans l'initiation et la progression tumorale (Feinberg *et al.*, 2004 ; Feinberg *et al.*, 2006 ; Feinberg, 2007 ; Jones and Baylin, 2007). De plus, de nombreuses mutations génétiques affectent également des acteurs épigénétiques (You and Jones, 2012). La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones sont donc altérées dans les cancers et l'expression des gènes y est dérégulée. C'est le cas en particulier des TSG, provoquant le développement et la progression d'un état malin.

2. Le contexte épigénétique du cancer

2.1. Une dérégulation de la méthylation de l'ADN

Les tissus tumoraux présentent une dérégulation de leur profil de méthylation de l'ADN en comparaison avec les tissus sains : il est observé une hypométhylation globale

du génome (Feinberg and Vogelstein, 1983 ; Gama-Sosa *et al.*, 1983) et une hyperméthylation de certaines régions spécifiques (Costello *et al.*, 2000 ; Esteller *et al.* 2001) [Figure 18].

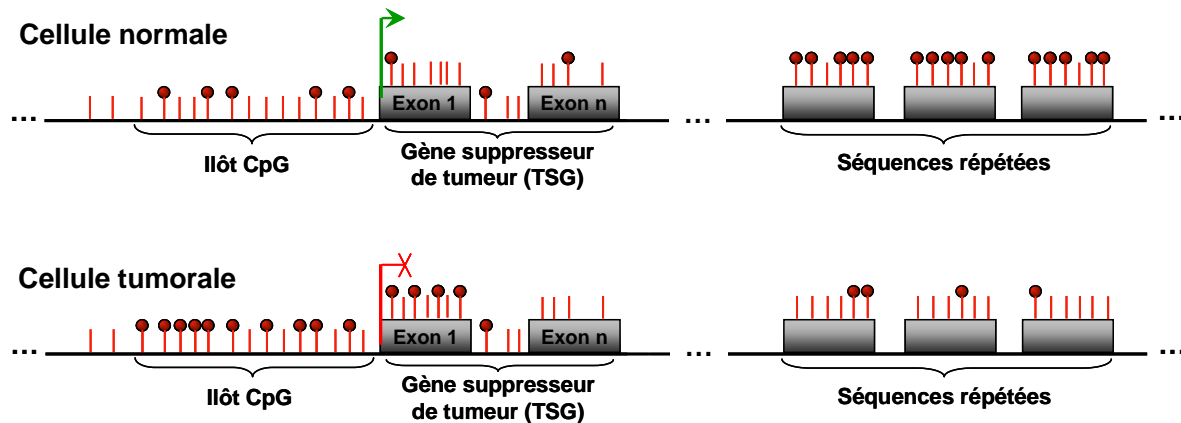


Figure 18. Profil de méthylation de l'ADN inversé dans les cellules cancéreuses.

L'analyse des taux de méthylation entre cellules normales et cellules tumorales, montre un niveau de méthylation plus élevé de certains îlots CpG, associé à une extinction du gène situé en aval. Il est également montré une diminution de méthylation au niveau des séquences répétées ce qui participe à une instabilité du génome.

2.1.1. L'hypométhylation globale du génome

Cette hypométhylation a lieu principalement sur les séquences répétées, où elle se trouve majoritairement, ce qui induit une instabilité chromosomique, des translocations et une réactivation des rétrotransposons (Howard *et al.*, 2008; Sharma *et al.* 2010). En effet, la perte de méthylation des séquences ADN telles que *LINE-1* et *ALU* réactiverait leur transcription et leur capacité à s'intégrer aléatoirement dans le génome (Dante *et al.*, 1992 ; Alves *et al.*, 1996).

Selon les études, l'hypométhylation tumorale est variable : de -10% dans les adénocarcinomes du colon à -25% dans les carcinomes ovariens et elle peut atteindre -40% dans les carcinomes hépatocellulaires (Ehrlich, 2002).

De manière très restreinte l'hypométhylation peut également affecter certains promoteurs et entraîner la transcription d'oncogènes tels que *R-RAS* et *RHOB* dans les cancers de l'appareil digestif (Nishigaki *et al.*, 2005) ou encore *MAGE* (Melanoma-associated Antigen) dans les mélanomes, le cancer du poumon et les cancers gastriques (De Smet *et al.*, 1999 ; Jang *et al.*, 2001). La perte de l'empreinte parentale par hypométhylation de l'ADN peut également entraîner une expression pathologique bi-

allélique comme c'est le cas pour *IGF2*, par exemple, qui constitue un marqueur prédictif de malignité dans les tumeurs rénales dites de Wilms (Ogawa *et al.* 1993 ; Ludgate *et al.* 2013).

L'hypométhylation globale du génome semble être une caractéristique commune à tous les types de cancers (Ehrlich, 2002). En apparaissant au cours des stades précoces ou tardifs de la tumorigénèse (Florl *et al.*, 1999), elle pourrait avoir un rôle initiateur (« driver ») et/ou passif (« passenger ») du processus tumoral : l'instabilité génomique et la ré-expression d'oncogènes causées par l'hypométhylation globale du génome confèreraient un avantage sélectif à la cellule qui deviendrait ensuite majoritaire au sein de la tumeur.

2.1.2. L'hyperméthylation spécifique de certains îlots CpG

i. Hyperméthylation des promoteurs de TSG et signature tumorale

De façon paradoxale à l'hypométhylation globale du génome, les cellules cancéreuses subissent aussi une hyperméthylation spécifique sur certains îlots CpG [Figure 18]. En comparant les profils de méthylation entre cellules normales et tumorales, il a été observé que des centaines de gènes présentent cette hyperméthylation. Il est estimé que 5 à 10% des promoteurs possédant un îlot CpG sont concernés, alors qu'ils sont dépourvus de méthylation dans les tissus sains. Cette hyperméthylation est corrélée à la répression transcriptionnelle du gène situé en aval (Bird, 2002).

Ainsi, l'hyperméthylation des promoteurs de TSG, associée à leur inactivation, est fréquente dans les cancers. Ces TSG peuvent être impliqués dans la prolifération cellulaire (*CDKN2A*, *CDKN2B*) (Merlo *et al.*, 1995), la réparation de l'ADN (*BRCA1*) (Esteller *et al.*, 2000), l'adhésion (*CDH1*) (Graff *et al.*, 1995) ou encore l'angiogénèse (*VHL*) (Herman *et al.*, 1994) [Tableau 3]. En plus d'une hyperméthylation directe des promoteurs des TSG, l'augmentation de la méthylation sur les promoteurs de facteurs de transcription peut également induire de façon indirecte la répression des TSG. On peut citer par exemple *RUNX3*, *GATA-4* et *GATA-5* qui sont hyperméthylés respectivement dans les cancers de l'œsophage et dans les cancers colorectaux et gastriques, conduisant à la non-transcription de leurs cibles (Akiyama *et al.* 2003 ; Long *et al.* 2007).

	Gènes hyperméthylés	Locus cytogenétique	Profil Tumoral
Cycle Cellulaire	<i>P16^{INK4a}</i>	9p21	Multiple
	<i>P15^{INK4b}</i>	9p21	Leucémies
	<i>P14^{ARF}</i>	9p21	Colon, estomac, rein
	<i>RB</i>	13q14	Retinoblastome
Transduction du signal	<i>RASSF1</i>	3p21.3	Multiple
	<i>APC</i>	5q21	Voies aérodigestives
	<i>P73</i>	1p36	Lymphome
Apoptose	<i>DAPK</i>	9q34.1	Lymphome, poumons, colon
	<i>TMS1</i>	16p11	Sein
Réparation de l'ADN	<i>MGMT</i>	10q26	Multiple
	<i>MLH1</i>	3p21.3	Colon, estomac
	<i>BRCA1</i>	17q21	Sein, ovaire
	<i>ER</i>	6q25.1	Sein
Réponse hormonale	<i>PR</i>	11q22	Sein
	<i>AR</i>	Xq11	Prostate
	<i>SOC3-1</i>	16p13.13	Foie
Cascade des tyrosine kinases	<i>SYK</i>	9q22	Sein
	<i>TIMP3</i>	22q12.3	Multiple
Adhésion cellulaire et invasion	<i>VHL</i>	3p25	Rein, hémangioblastome
	<i>CDH1</i>	16q22.1	Sein, estomac, leucémies
	<i>CDH13</i>	16q24	Sein, poumons
	<i>GSTP1</i>	11q13.2	Prostate, sein, rein
Métabolisme			
Inflammation	<i>COX-2</i>	1q25	Colon, estomac
Transcription	<i>RIZ1/PRDM2</i>	1p36	Sein, foie

Tableau 3. Gènes hyperméthylés dans les cancers.

Ce tableau représente une liste non exhaustive de gènes dont les promoteurs sont hyperméthylés dans les cancers. Tableau mis en forme à partir de (Esteller, 2002; Esteller, 2007).

En réalité, tous les TSG ne sont pas hyperméthylés dans tous les types tumoraux ; Esteller a décrit **des hyperméthylomes spécifiques de chaque type de cancer** (Esteller *et al.*, 2001; Esteller, 2007; Esteller, 2008). Par exemple, l'hyperméthylation du gène *GSTP1* est retrouvée de manière récurrente dans les cancers de la prostate et du foie (Lee *et al.*, 1994), tandis que l'hyperméthylation de *MLH1* est typique des cancers de l'estomac et du colon (Herman *et al.*, 1998 ; Veigl *et al.*, 1998). Ainsi, selon le type tumoral, un panel de gènes serait spécifiquement soumis à une méthylation aberrante, révélant **une signature tissu spécifique** (Costello *et al.*, 2000 ; Esteller *et al.*, 2001 ; Paz *et al.*, 2003).

ii. Quel(s) mécanisme(s)

Cette méthylation anormale peut être due à **une surexpression des DNMT** (Mizuno *et al.*, 2001) mais également à des **interactions des DNMT avec d'autres effecteurs épigénétiques comme les HDAC ou les HMT**. Schlesinger *et al.* ont en effet montré que les régions du génome hyperméthylées dans les cancers sont souvent pré-marquées par la **triméthylation de H3K27** (Schlesinger *et al.*, 2007). Ce résultat suggère que la dérégulation de **la méthylation de l'ADN est intimement liée à d'autres modifications épigénétiques**. Williams *et al.* ont aussi proposé que ce phénotype hyperméthylé des cancers serait dû à une **mutation ou une sous-expression des protéines TET** (Williams *et al.*, 2012).

Par ailleurs, même si aucune séquence consensus n'a pu être clairement établie, des études ont montré que **certains motifs sont enrichis** de manière significative dans les promoteurs hyperméthylés (Feltus *et al.*, 2003 ; Feltus *et al.*, 2006 ; Keshet *et al.*, 2006 ; An *et al.*, 2013). Ces motifs ne correspondent cependant à aucun site de fixation de protéines connues.

Frigola *et al.*, ont également montré qu'une région chromosomique entière (4 Mb localisées en 2q14.2), dite **LRES** (Long-range epigenetic silencing), pouvait être soumise à une répression épigénétique associant la méthylation de l'ADN avec celle de H3K9 (Frigola *et al.*, 2006). Plus récemment, 47 LRES ont également été identifiées dans des cellules tumorales de prostate (Coolen *et al.*, 2010).

Enfin, la **présence de rétrotransposons LINE et SINE à proximité des promoteurs** les rendrait résistants à la méthylation alors que l'absence de ces séquences répétées serait un facteur prédisposant les gènes à l'hyperméthylation. La seule étude de la distribution des éléments transposables permet de prédire la prédisposition d'un gène à la méthylation (Estécio *et al.*, 2010).

Différents processus semblent donc être à l'origine de l'hyperméthylation des îlots CpG dans les cancers. Il ne s'agit pas d'un seul mécanisme mais plutôt d'un ensemble de facteurs agissant de manière concomitante ou non. Et comme pour les mutations, ces épimutations peuvent apparaître de manière aléatoire ou déterminée et avoir un rôle dans l'initiation du cancer (Feinberg, 2007).

2.2. Une dérégulation des marques d'histones

2.2.1. Quelles modifications ?

Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes épigénétiques coopèrent dans l'établissement d'un profil d'activation ou de répression de la transcription. Il n'est donc pas surprenant que les îlots CpG ciblés par la méthylation de l'ADN dans les cellules tumorales présentent des modifications des marques d'histones (Sawan and, Herceg, 2010 ; Du *et al.*, 2015). Les modifications les plus fréquentes dans les cancers sont une perte d'acétylation des histones H3 et H4, la perte de la marque activatrice H3K4me3 et le gain des marques répressives H3K9me3 et H3K27me3. Ces deux dernières modifications sont les acteurs principaux des répressions génétiques aberrantes identifiées dans les cancers (Fraga *et al.*, 2005; Füllgrabe *et al.*, 2011; Waldmann and Schneider, 2013).

Comme pour l'hypométhylation globale de l'ADN, il a également été décrit, dans les cellules tumorales, une perte des marques H4K16ac et H4K20me3 à l'échelle du génome (Tryndyak *et al.*, 2006).

2.2.2. Avec quels acteurs ?

Ces dérégulations sont généralement l'œuvre d'une perturbation des enzymes contrôlant les modifications post-traductionnelles des histones. Ainsi, les HMTs MLL1, 2 et 3, spécifiques de H3K4, sont mutées ou subissent des translocations dans différents types de lymphomes et de leucémies. Des mutations activatrices du domaine catalytique SET de l'HMT EZH2 sont également décrites dans les lymphomes (Butler *et al.*, 2012 ; Shih *et al.*, 2012).

Les enzymes qui éliminent les modifications des histones sont également impliquées. L'HDM LSD1 spécifique de H3K4 et H3K9 est mutée dans le cancer de la prostate et l'HDAC SIRT1 est mutée dans les cancers du sein, de la prostate et du colon (You and Jones, 2012).

2.3. Dérégulation du positionnement des nucléosomes

Le positionnement des nucléosomes est régulé à la fois par la méthylation de l'ADN et par les modifications des histones. Ainsi, dans une cellule tumorale, les promoteurs des TSG hypeméthylés et présentant des marques d'histone répressives,

sont occupés par des nucléosomes, ce qui entraîne une répression de la transcription. Il a d'ailleurs été montré que la ré-activation de l'expression de ces gènes en présence d'inhibiteurs de DNMT est associée à un déplacement des nucléosomes en amont du TSS (Lin *et al.* 2007). Certaines protéines de remodelage de la chromatine sont également dérégulées dans les cancers (You and Jones, 2012) : par exemple, une perte d'expression de la sous-unité *BAF47* du complexe *SWI-SNF* inhibe la déstabilisation des nucléosomes et favorise des transformations oncogéniques, via l'inactivation des voies de signalisation *CDKN1A* et *CDKN2A* (Chai *et al.* 2005).

La dérégulation du positionnement des nucléosomes est également lié au variant d'histone H2AZ. En effet, la sur-expression de H2A.Z dans différents types de cancers est corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire via un effet indirect sur *P53* (Svotelis *et al.* 2009). La perte de H2A.Z induirait, dans certains cas, une hyperméthylation des TSG entraînant une progression tumorale (Witcher and Emerson 2009).

2.4. Une dérégulation des ARN non-codants

De nombreuses études montrent une dérégulation des profils d'expression des ARNnc dans les tumeurs (Hernando, 2007 ; Negrini *et al.* 2009). Certains ARNmi qui ciblent des **oncogènes** peuvent être sous-exprimés dans les tumeurs (exemple de *let-7* ciblant *RAS*), tandis que ceux visant des **TSG** sont généralement sur-exprimés dans les tumeurs (par exemple *miR-21* qui cible *PTEN*) (Sharma *et al.*, 2010 ; Melo and Esteller, 2011).

Certains ARNnc, **modulateurs de l'expression d'effecteurs épigénétiques**, sont également identifiés comme étant dérégulés dans des cancers. Une sous-expression de *miR29* est notamment identifiée dans le cancer du poumon, conduisant à une sur-expression de ses cibles, DNMT3A et DNMT3B (Fabbri *et al.*, 2007). *miR-101* ciblant EZH2 est également sous-exprimé dans certains cancers, ce qui conduit à une augmentation de la méthylation des histones et des répressions aberrantes de gènes (Friedman *et al.*, 2009).

Comme pour les gènes, les dérégulations de l'expression des ARNnc sont la cause de divers mécanismes comme des translocations chromosomiques, des perturbations de leur transcription et également une hyperméthylation de leurs promoteurs (Suzuki *et al.*, 2012 ; Vrba *et al.*, 2013).

3. En résumé

Le développement d'un cancer résulte d'une accumulation d'évènements qui désorganisent les principales voies de régulation cellulaire en faveur d'une progression tumorale par l'activation d'oncogènes et / ou l'inhibition de TSG. Ainsi, **l'inhibition, par une hyperméthylation**, de l'expression TSG et de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*BRCA1*, *MLH1*, *MGMT*...) **va entraîner l'apparition de mutations génétiques**. A l'inverse, **des mutations ou des délétions** dans les séquences de gènes de la méthylation de l'ADN (DNMTs), de la déméthylation (*TET*, *IDH1* et *AID*), de la modification des histones (*EZH2*, *LSD1*, *SIRT1*, HDACs...) et du remodelage de la chromatine (*ARID1A*...) **vont entraîner des dérégulations épigénétiques**. Une étude a ainsi montré que **tous les acteurs du paysage épigénétique sont dérégulés dans les cancers**, démontrant l'importance du rôle de l'épigénétique dans la tumorigénèse (You and Jones, 2012).

Chapitre 3 – L'épigénétique : une cible thérapeutique

Contrairement aux mutations génétiques, les « **épi-mutations** » **apposées par la méthylation de l'ADN et les modifications des histones sont réversibles**. Cette réversibilité, en fait un **phénomène particulièrement intéressant en pharmacologie** en tant que **nouvelle(s) cible(s) thérapeutique(s)** (Feinberg, 2007; Esteller, 2012 ; Zaidi *et al.*, 2012 ; Adwan and Zawia, 2013).

L'approche épigénétique du traitement du cancer est une vision différente et nouvelle de la chimiothérapie classique qui consiste, elle, à détruire la tumeur par l'action d'agents cytotoxiques qui tuent toutes les cellules. La sélectivité, dans ce cas, se fait sur la différence de vitesse de prolifération des cellules tumorales, plus rapide que celle des cellules saines. Depuis une dizaine d'année des thérapies ciblées ont permis de minimiser les effets secondaires des traitements anticancéreux et aujourd'hui la stratégie d'utiliser des modulateurs épigénétiques est basée sur une réactivation possible des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette « reprogrammation » permet de restaurer l'organisation cellulaire et d'**activer les mécanismes de contrôle et de défenses**, comme le système immunitaire, qui sont inhibés, (Azad *et al.*, 2013). Cette stratégie épigénétique est également capable de reprogrammer des cellules chimiorésistantes et de les **rendre à nouveaux sensibles à la chimiothérapie** (Clozel *et al.*, 2013).

1. Le caractère réversible des marques épigénétiques

1.1. Quelle(s) modification(s) faut-il cibler ?

Les marques épigénétiques les plus importantes à cibler sont les modifications d'histones et la méthylation de l'ADN, qui peuvent être régulées par l'inhibition des nombreuses enzymes responsables de ces modifications (Popovic and Licht, 2012).

Les modifications des histones, plus labiles que la méthylation de l'ADN, ont été étudiées en détails et constituent les thérapies les plus avancées dans la thérapie épigénétique avec quatre composés approuvés en clinique (Chapitre 3 § 2.1.1).

1.2. Effacer les modifications d'histones

1.2.1. Les HDACs déacétylent les histones

Chez l'homme, on recense 18 HDACs, réparties en 3 familles (Vandermeers *al.*, 2008) :

- La classe I constituée de HDAC 1, 2, 3 et 8 a une localisation nucléaire.
- La classe II constituée de HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10 est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme.
- La classe III constituée de SIRT 1 à 7 ne présente pas de similitudes avec les HDACs de classe I et II et possède une activité enzymatique dépendante du cofacteur NAD⁺.

HDAC 11 présente des homologies avec les HDACs de classe I et II et est classée à part.

Comme décrit précédemment (chapitre 1 § 3.2.1), les HDACs induisent une compaction de l'ADN autour des histones par suppression des groupements acétyle présents sur les queues des histones, ce qui se traduit par une répression de la transcription.

1.2.2. Les HDMs déméthylent les histones

Les lysines des histones peuvent être déméthylées par des lysines déméthylases (KDM). LSD1, a été la première HDM décrite spécifique des lysines. Elle agit à la fois sur la marque activatrice H3K4 et sur la marque inhibitrice H3K9 (Shi *et al.*, 2004). Depuis, d'autres HDM spécifiques des lysines ont été identifiées : JHDM et JMJD2 spécifiques de H3K9, JHDM1 spécifique de la marque activatrice H3K36, tandis que JMJD2A/JHDM3A et JMJD2C/GASC1 agissent à la fois sur H3K9 et H3K36.

Les KDM sont divisées en deux familles établies sur une base phylogénétique et suivant leur mécanisme catalytique [Figure 19] (Maes *et al.*, 2015). Les différents KDM sont ainsi décrites pour déméthyliser les marques d'histones H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 et H4K20 mono-, di- ou triméthylées [Figure 19]. Le statut de méthylation et le positionnement des marques d'histones par rapport aux gènes, affecte le niveau de transcription des gènes. Les marques H3K4me2/me3, H3K79me3 et H3K36me2/me3 sont

préférentiellement associée à l'activité transcriptionnelle, tandis que la méthylation de H3K9me2/me3, H3K27me2/me3, et H4K20me3 sont associés à une répression.

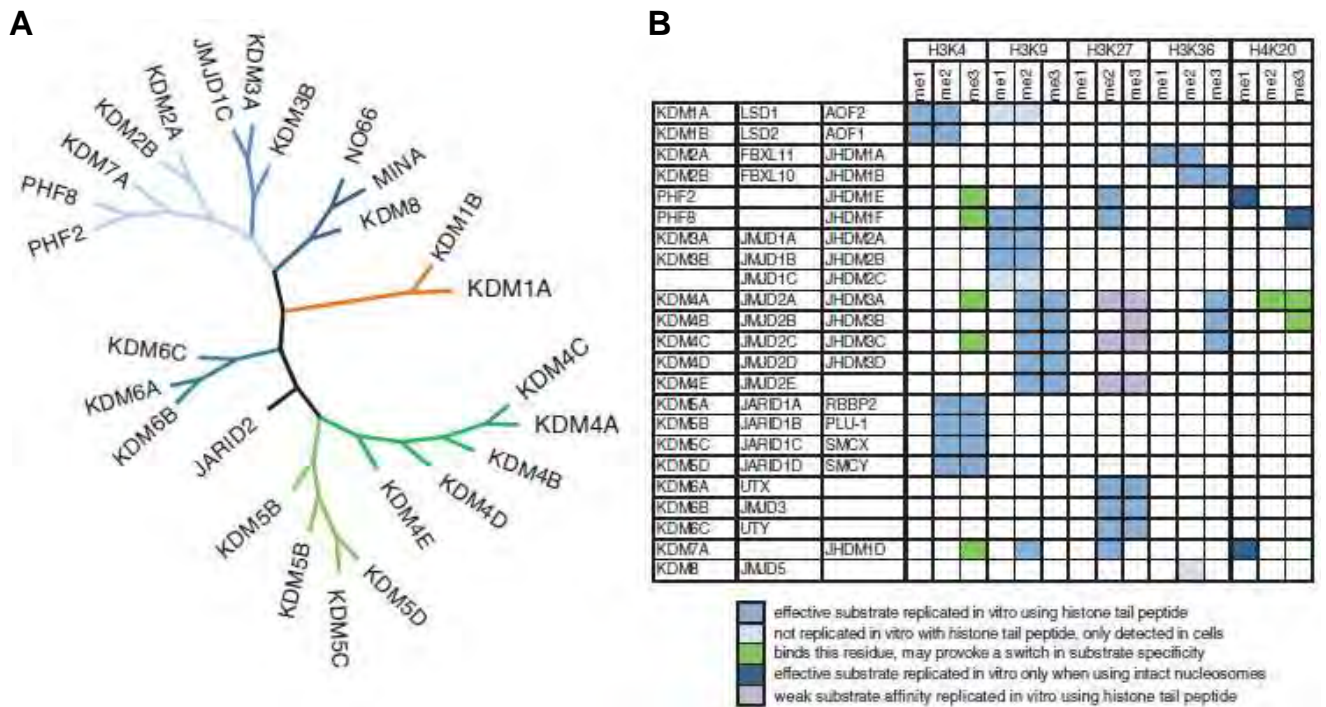


Figure 19. Les histones déméthylases.

A. Arbre phylogénétique des lysines déméthylases d'histone. **B.** Tableau reflétant les spécificités de liaison et de déméthylation pour les différentes enzymes. Figure tirée de (Maes *et al.*, 2015).

1.3. Effacer la méthylation de l'ADN

La déméthylation de l'ADN est un phénomène complexe à étudier. En effet, la déméthylation d'un promoteur n'est pas systématiquement liée à la ré-expression de ce dernier (Flotho *et al.*, 2009). Pour expliquer ces résultats, la méthylation est souvent décrite comme un verrou : pour ouvrir la porte de la transcription, il faut donc à la fois débloquent le verrou de la méthylation de l'ADN et actionner la poignée régulée par les marques d'histones.

Mais quelle(s) DNMT(s) inhiber ? Aujourd'hui, l'utilisation d'analogues de nucléosides (Chapitre 3 § 2.2.1) valide une approche d'inhibition non sélective. Cependant, de nombreux articles rapportent que l'inhibition *in vitro* de DNMT1 seule suffit à observer une activité anti-tumorale. En effet, il a été démontré que l'inactivation de DNMT1 par ARN interférence conduit à un arrêt de la croissance de cellules tumorales (Chik and Szyf, 2011). De même, plusieurs observations montrent que la suppression de DNMT1 entraîne une ré-expression de TSG et un arrêt de la prolifération

cellulaire dans de nombreux types de cancers (Suzuki *et al.*, 2004 ; Kassis *et al.*, 2006 ; Gao *et al.*, 2013).

Les rôles de DNMT3A et DNMT3B semblent beaucoup plus complexes, étant donné qu'ils sont dépendants du contexte dans lequel ces enzymes sont exprimées.

En effet, la présence de mutation(s) inactivatrice(s) de DNMT3A (en particulier sur l'arginine 882) chez des patients atteints de syndrome myélodysplasique (MDS) ou de leucémie aiguë myéloïde (AML), est associée à un très mauvais pronostic (Ley *et al.*, 2010 ; Walter *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015 ; Ahn *et al.*, 2015). Cependant, d'autres études semblent montrer que les patients atteints de ces mutations présentent une meilleure réponse aux traitements par des inhibiteurs de DNMT (Metzeler *et al.*, 2012 ; Traina *et al.*, 2014).

De la même façon que pour DNMT3A, l'inactivation de DNMT3B dans un lymphome murin induit par *Myc*, accélère la prolifération tumorale par une induction de l'oncogène *Ment* (Hlady *et al.* 2012). Mais, comme pour DNMT1, il a été mis en évidence que la déplétion de DNMT3B induit à la fois un arrêt de la prolifération cellulaire et l'apoptose dans le cancer de la prostate, du poumon, du pancréas et de l'œsophage (Kassis *et al.*, 2006; Yaqinuddin *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2013).

Il semble intéressant de chercher à inhiber de manière sélective chaque DNMT pour obtenir des effets anti-tumoraux, mais aussi dans le but d'avoir une toxicité sur les cellules saines plus faible que celle observée avec des inhibiteurs pan-DNMT. De plus, certains cancers présentent une sur-expression de DNMT3A ou de DNMT3B, et dans ces cas, leur inhibition spécifique est également une approche intéressante.

2. La thérapie épigénétique dans le cancer

2.1. Les inhibiteurs des modifications d'histones

2.1.1. Les inhibiteurs de HDACs

Les inhibiteurs de HDAC constituent un axe important dans la thérapie épigénétique du cancer (Seidel *et al.*, 2012). En effet les HDAC sont souvent sur-exprimées dans les cancers (Halkidou *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005) conduisant à une perte d'acétylation des histones et à une répression transcriptionnelle des gènes concernés. Les inhibiteurs étudiés à ce jour provoquent l'arrêt de la prolifération des

cellules cancéreuses, l'induction de leur différenciation et/ou leur mise en apoptose (Marks *et al.*, 2001 ; Kramer *et al.*, 2001 ; Kelly *et al.*, 2002).

Parmi les nombreux inhibiteurs de HDAC existant [Tableau 4] quatre composés ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (Licciardi *et al.* 2012) pour leur activité anti-tumorale: le **vorinostat**, approuvé pour le traitement des lymphomes cutanés et en essai clinique pour différentes tumeurs solides, la **romidepsin** qui est un peptide cyclique approuvé pour le traitement des lymphomes cutanés et périphériques des cellules T (PTCL) (Ververis *et al.*, 2013), le **belinostat** qui a été approuvé pour ces mêmes PTCL (Bodiford *et al.*, 2014) et le **panobinostat** récemment approuvé en combinaison avec le bortezomib et la dexaméthasone pour le traitement de patients atteints de myélome multiple en rechute et/ou réfractaire ayant déjà reçu au moins deux lignes de traitement antérieur incluant le bortézomib et un agent immunomodulateur (Andreu-Vieyra and Berenson, 2014) .

D'autre part, JQ1, une petite molécule spécifique des bromodomains a été mise en évidence pour sa capacité à inhiber toutes les protéines qui reconnaissent les lysines acétylées (Filippakopoulos *et al.*, 2010 ; Nicodeme *et al.*, 2010). Cela en fait un bon agent thérapeutique pour les tumeurs à cellules squameuses impliquant des translocations de BRD4 (Schwartz *et al.*, 2011).

2.1.2. Les inhibiteurs de HMTs

Comme les HDAC, les HMTs sont souvent surexprimées dans les cancers (G9a, EHMT2, SMYD3...). Certaines translocations (MLL, NSD1...) entraînent également la formation de protéines de fusions aberrantes dont l'expression est alors dérégulée.

Plusieurs composés développés par la société Epizyme visent principalement DOT1L, une HMT spécifique de H3K79, et EZH2, une sous unité catalytique de PRC2. La molécule **EPZ-5676**, inhibitrice de DOT1L, a fait l'objet d'une étude clinique débutée en septembre 2012 (Daigle *et al.*, 2013; Klaus *et al.*, 2014), qui a dû être arrêtée en 2015 par manque d'efficacité, tandis que la molécule **EPZ-6438** (Tazemetostat) qui cible EZH2 est toujours en développement clinique (Phase 1/2) depuis juin 2013 (Knutson *et al.*, 2014) et donne des résultats encourageant.

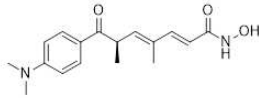
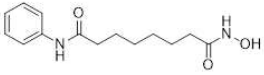
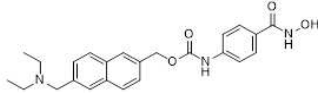
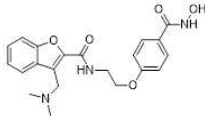
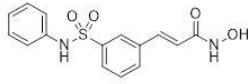
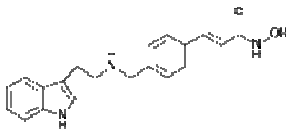
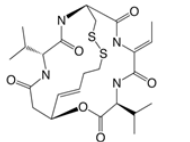
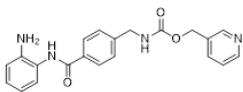
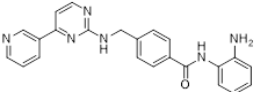
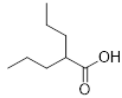
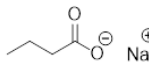
HDAC inhibiteur	Structure	Spécificité	Essais clinique
Acides hydroxamiques			
Trichostatine A (TSA)		Classes I, II et III	
Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)		Classes I, II et III	AMM – FDA (2006), phase II, III
Givinostat (ITF2357)		Classes I et II	Phase I, II
Abexinostat (PCI-24781)		Classes I, II et III	Phase I, II
Belinostat (PXD101)		Classes I, II et III	AMM – FDA (2014)
Panobinostat (Farydak, LBH-589)		Classes I, II et III	AMM – FDA (2015)
Petide Cyclique			
Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR 901228, FK228, depsipeptide)		Classe I	AMM – FDA (2009), phase I, II
Benzamides			
Entinostat (MS-275)		Classe I	Phase II
Mocetinostat (MGCD0103)		Classe I	Phase I, II
Acides gras			
Acide Valproïque (VPA)		Classe I et II	Phase I, II, III
Butyrate de sodium		Classe I et II	Phase II

Tableau 4. Les inhibiteurs de HDAC.

Ce tableau représente une liste des inhibiteurs de HDAC, leur spécificité d'activité pour les classes d'HDAC et leur stade de développement clinique.

2.1.3. Les inhibiteurs de HDMs

Les premiers composés connus pour inhiber la lysine déméthylase d'histone KDM1 sont la Phenelzine, la Tranylcypromine et la Pargyline [Figure 20] (Lee *et al.*, 2006 ; Schmidt *et al.*, 2007). La Daminozide [Figure 20], un composé utilisé en agrochimie (maintenant en grande partie abandonnée) a également été décrit pour inhiber les enzymes de la famille KDM2 (Brown *et al.*, 1997). D'autres composés ont par ailleurs pu être identifiés comme des inhibiteurs d'HDMs (Thinnes *et al.*, 2014 ; Maes *et al.*, 2015).

Trois molécules, inhibitrices de KDM1A/LSD1, sont aujourd'hui en développement clinique. Deux composés [Figure 20] développés par le laboratoire pharmaceutique GlaxoSmithKline, **GSK-J1** (Kruidenier *et al.*, 2012) et **GSK2879552** (NCT02034123 et NCT02177812) (Kruger *et al.*, 2013), ce dernier étant un inhibiteur sélectif et irréversible de KDM1A/LSD1. Le composé **ORY-1001** [Figure 20] est également un inhibiteur sélectif et puissant de KDM1A/LSD1. Une étude récente a montré que ce composé induit l'apoptose et une inhibition de la prolifération de cellules de cancers myéloïdes à des concentrations sub-nanomolaires (Maes *et al.*, 2013). Ce composé de la société Orizon Genomics est actuellement en phase I de développement clinique au Royaume-Uni et en Espagne, en partenariat avec le laboratoire pharmaceutique Roche.

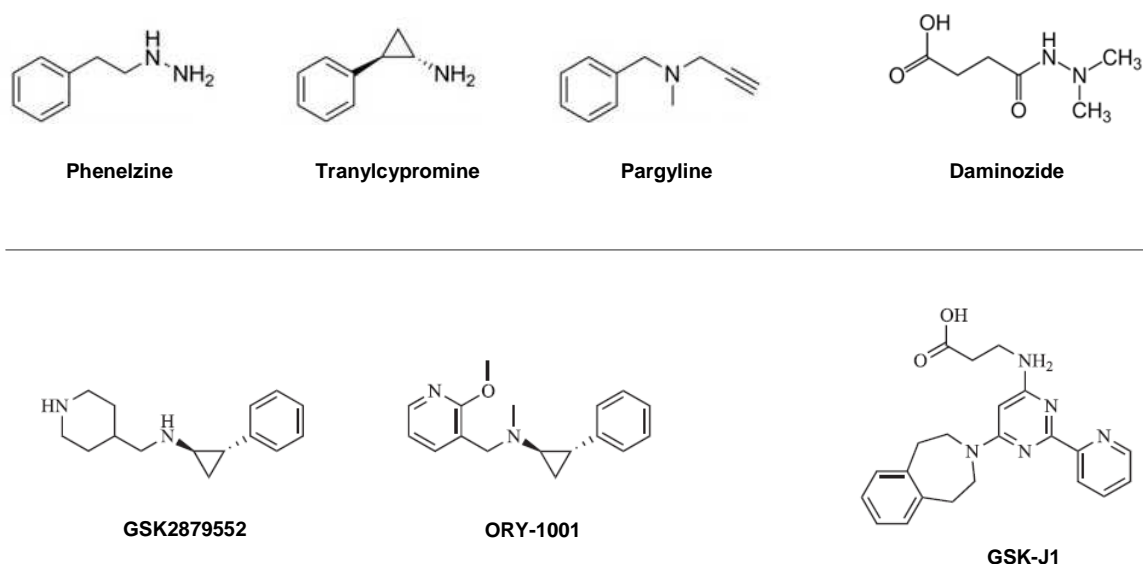


Figure 20. Les inhibiteurs de HDMs.

2.2. Les inhibiteurs de DNMTs

Beaucoup d'inhibiteurs de DNMTs sont décrits, mais peu présentent à la fois une sélectivité et une bonne efficacité. Seulement deux de ces inhibiteurs ont obtenu une autorisation de mise sur le marché, mais l'identification et la caractérisation de nouveaux inhibiteurs de DNMT plus puissants est une voie thérapeutique qui reste encore à explorer. C'est sur ce sujet que nous nous sommes concentrés lors de cette thèse (Gros *et al.*, 2013; Rilova *et al.*, 2014; Erdmann *et al.*, 2015a; Erdmann *et al.*, 2015b, Annexes 1 à 4 ; Halby *et al.*, en préparation ; Menon *et al.*, soumis pour publication).

L'ensemble des inhibiteurs de DNMT peut être divisé en deux familles : les analogues de nucléosides, qui sont connus depuis les années 1960 (Pliml and Sorm, 1964 ; Sorm and Vesely, 1968) et qui ont été largement étudiés, et les inhibiteurs non nucléosidiques dont les structures sont beaucoup plus variables (Brueckner *et al.*, 2007; Gros *et al.*, 2012).

2.2.1. Les inhibiteurs nucléosidiques

Ces composés sont constitués d'une base cytosine modifiée et rattachée à un ribose ou désoxyribose [Figure 22]. Ils sont métabolisés par des enzymes kinases qui les convertissent en nucléotides qui seront incorporés à la place de la cytosine, à la fois dans l'ADN et l'ARN (ribose) ou seulement dans l'ADN (désoxyribose) (Momparker, 2005). Lors du processus de méthylation de l'ADN, les cytosines forment un intermédiaire covalent avec les DNMTs permettant le transfert de groupements méthyles (CH_3) depuis le SAM [Figure 21]. L'absence de proton en position 5 de la cytosine modifiée de ces inhibiteurs nucléosidiques, empêche la β -élimination et piège l'enzyme. Ainsi ces molécules agissent comme substrat-suicide des DNMTs (Santi *et al.*, 1984 ; Schermelleh *et al.*, 2005).

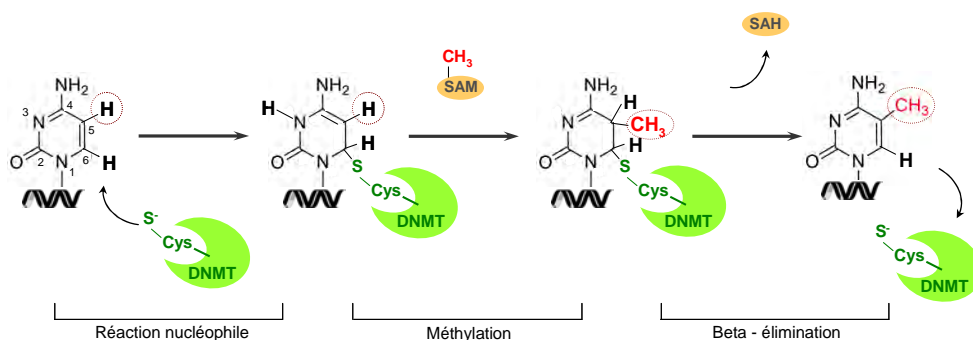


Figure 21. Mécanisme de méthylation de la cytosine par les DNMTs.

Le résidu cystéine du site catalytique des DNMTs se lie à la cytosine permettant sa méthylation en position C5. Figure adaptée de (Zhu *et al.*, 2015).

i. Les inhibiteurs de première génération

La **5-azacytidine** (5azaC) et la **5-aza-2'-désoxycytidine** (5azadC) ont été synthétisées en 1964 comme anti-métabolites et agent cytotoxique dans le traitement des leucémies (Sorm and Vesely 1968). Cette activité antinéoplasique a été confirmée par la suite lors d'essai clinique de phase I/II (Rivard *et al.*, 1981 ; Momparler *et al.*, 1985a ; Richel *et al.*, 1991). C'est en 1979 que Taylor et Jones ont mis en évidence la capacité de ces molécules à inhiber la méthylation de l'ADN et à reprogrammer les cellules (Taylor and Jones, 1979 ; Jones and Taylor, 1980). L'existence d'une corrélation entre l'effet anti-leucémique *in vivo* obtenu avec la 5azadC et sa capacité à inhiber la méthylation a également été mis en évidence (Wilson *et al.*, 1983; Momparler *et al.*, 1985b). De plus, certaines études ont montré que ce composé était plus actif *in vivo* (Momparler *et al.*, 1985c; Onetto *et al.*, 1987) que la cytosine arabinoside (AraC), l'anti-métabolite de référence dans le traitement des leucémies.

L'aboutissement d'études cliniques de ces molécules a représentée une avancée majeure, apportant une preuve de concept dans la stratégie de thérapie épigénétique. En effet, administrés à faible dose chez les patients, afin de prévenir les effets cytotoxiques tout en agissant sur le niveau de méthylation, le Vidaza (5azaC) et le Dacogen (5azadC) révèlent une activité antitumorale significative. La réactivation de TSG comme *CDKN2B* est observée chez les patients traités et pourrait expliquer les effets anti-tumoraux observés (Daskalakis *et al.*, 2005). Ces deux molécules ont obtenu respectivement, en 2004 et 2006, l'autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis (Kaminskas *et al.*, 2005 ; Kantarjian *et al.*, 2006) puis par l'Agence européenne des médicaments (EMA - European Medicines Agency). Le Vidaza et le Dacogen sont préconisés pour le traitement du syndrome myélodysplasique (MDS), des leucémies myéloïdes aiguës (AML) et des leucémies myéloïdes monocytaires chroniques (CMML). Ces molécules sont également en phase clinique II pour le traitement de tumeurs solides telles que le mélanome, les cancers des ovaires, du sein, du poumon, du colon ou de la prostate (Schrump *et al.*, 2006 ; Stewart *et al.*, 2009).

Plus de 300 essais cliniques impliquent actuellement ces deux composés (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=vidaza>), inhibiteurs de la méthylation, en combinaison avec notamment des inhibiteurs de HDAC dans de nombreux cancers (Juergens *et al.*, 2011; Hatzimichael and Crook 2013). On peut également noter l'utilisation de ces molécules en tant qu'agents sensibilisants à la chimiothérapie

classique (Bhatla *et al.*, 2012; Matei *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; Steinhardt and Gartenhaus, 2013; Clozel *et al.*, 2013) et à l'immunothérapie (Li *et al.*, 2014 ; Chiappinelli *et al.*, 2015).

D'autres analogues ont ensuite été développés comme la **5-aza-5,6-dihydrocytidine**, composé moins puissant resté au stade préclinique, ou la **5-fluoro-2'-désoxycytidine** qui est un inhibiteur actuellement en phase I contre les leucémies et certaines tumeurs solides.

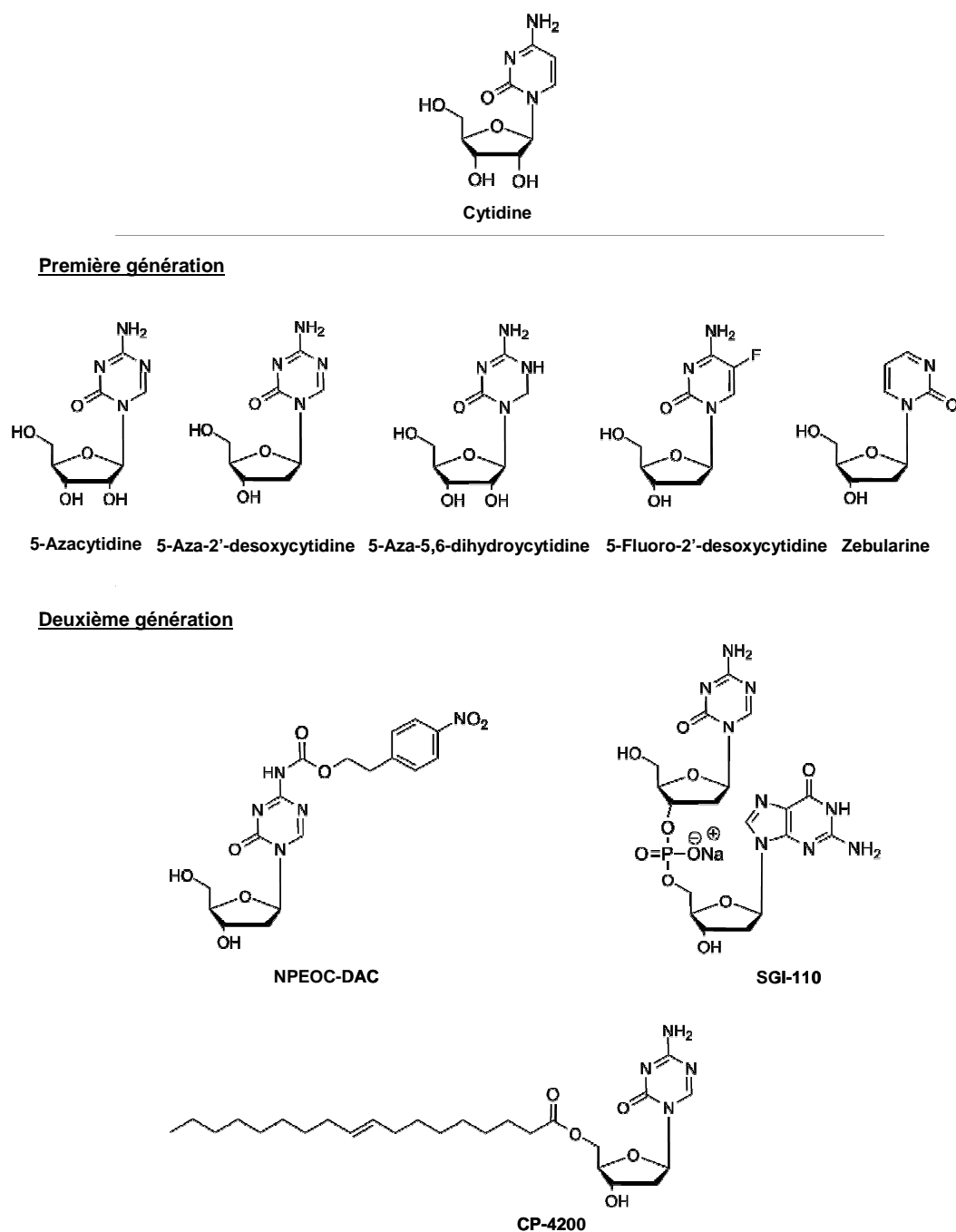


Figure 22. Les analogues de nucléosides inhibiteurs de DNMT.

Enfin, un autre analogue de nucléoside, la **zébularine**, qui possède une activité intrinsèque d'inhibiteur de désaminase (Frick *et al.*, 1989), a été initialement synthétisée (Funakoshi *et al.*, 1961) afin d'augmenter la stabilité de l'azacitidine ou la decitabine qui peuvent subir une désamination (Zhou *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003). Cependant, de plus fortes concentrations doivent être utilisées dans les études cellulaires, limitant son utilisation (Cheng *et al.*, 2004).

ii. Les inhibiteurs de deuxième génération

Sur la base de l'instabilité chimique de la 5azaC et de la 5azadC, dû à une hydrolyse de ces molécules en solution (Notari and DeYoung, 1975 ; Chan *et al.*, 1979 ; Christman, 2002), et des résultats obtenus en tant qu'inhibiteurs de DNMTs, d'autres composés [Figure 22] ont été synthétisés dans le but d'obtenir un meilleur profil pharmacocinétique (Yang *et al.*, 2010).

Il s'agit de pro-drogues comme le **NPEOC-DAC** (Byun *et al.*, 2008). Cette molécule nécessite une activation par la carboxylestérase 1 (hCE-1), présente dans certaines lignées de cancer du foie, afin de libérer la 5azadC. Malheureusement, si cette protection empêche la 5azadC de subir une éventuelle désamination, elle diminue également drastiquement son efficacité et réduit son champ d'application.

De même, le **CP-4200** et le **SGI-110** [Figure 22] sont respectivement des pro-drogues de 5azaC et de la 5azadC. Permettant la délivrance plus tardive d'une molécule instable, ils permettent d'augmenter l'efficacité et donc de diminuer les doses efficaces, limitant ainsi la cytotoxicité et les effets secondaires. Le SGI-110 fait l'objet d'une étude clinique de phase I pour les AML et les MDS (Chuang *et al.*, 2010; Issa *et al.*, 2015), ainsi que dans les cancers ovariens résistants en tant qu'agent sensibilisant en combinaison avec le carboplatine (Kuang *et al.*, 2015).

Nécessitant, la plupart du temps, une étape d'intégration dans le génome au cours de la phase S pour être actives, ces inhibiteurs nucléosidiques permettent une forme de sélectivité pour les cellules en division rapide. Cependant ces molécules sont loin d'être idéales du fait de leur faible biodisponibilité, de leur instabilité dans les milieux physiologiques et de leur manque de sélectivité au niveau des CpG. De plus, des questions sur l'effet à long terme de ces analogues de nucléosides commencent à se poser (Gravina *et al.* 2010). C'est donc vers des molécules non-nucléosidiques que la

recherche s'est orientée pour développer des inhibiteurs de DNMTs ne nécessitant pas d'intégration dans le génome.

2.2.2. Les inhibiteurs non-nucléosidiques

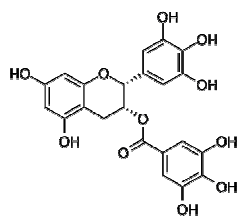
De nombreux inhibiteurs catalytiques des DNMTs ont été décrits ces dernières années avec des structures très variées [Figure 23], mais peu d'entre eux ont réussi à démontrer une véritable activité déméthylante au niveau cellulaire. Parmi ces nombreuses molécules, on peut distinguer les composés synthétiques de ceux qui ont une origine naturelle.

i. Les molécules naturelles

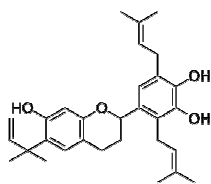
Une des familles les plus étudiées est la famille des flavonoïdes dont l'**EGCG** (gallate d'épigallocatechine) [Figure 23], le polyphénol majoritaire du thé vert, présente une activité d'inhibition des DNMTs (Lee *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2011). La **génistéine** [Figure 23], une isoflavone extraite du soja, a également démontré son caractère d'inhibiteur de la méthylation. Ces deux molécules ont démontré des activités cellulaires menant à la déméthylation avec une ré-expression de gènes suppresseurs de tumeurs comme *RAR β* , *CDKN2B* ou *MGMT* (Fang *et al.*, 2005; Nandakumar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014). Cependant, tout comme la génistéine, les polyphénols sont connus pour inhiber de nombreuses enzymes (Ju Fang *et al.*, 2007, Chen Fang *et al.*, 2007). Leur mécanisme d'action a été étudié et ils sont capables d'inhiber la catéchol-*O*-méthyltransférase (une enzyme utilisant le co-facteur SAM), (Lee *et al.*, 2005) ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration intracellulaire de SAH. L'équilibre SAM/SAH étant perturbé, l'efficacité des DNMTs est diminuée par la perte du co-facteur et non par l'action directe de l'EGCG. De plus, la cytotoxicité connue de l'EGCG est liée à sa capacité à produire des espèces réactives oxygénées (ROS) responsables d'un stress oxydatif qui expliquerait l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses observée *in cellulo* (Chuang *et al.*, 2005). Finalement, les études réalisées avec l'EGCG et la génistéine n'ont pas révélé d'hypométhylation génomique et ces composés ne sont donc pas considérés comme des inhibiteurs directs de DNMTs.

Néanmoins les propriétés préventives de ces molécules et des extraits de thé vert dans la cancérogénèse sont malgré tout reconnues et continuent à être étudiées dans la prévention des cancers (Suh and Pezzuto 2012).

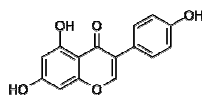
Molécules naturelles



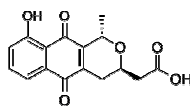
EGCG
(-) Epigallocatechin-3-O-gallate



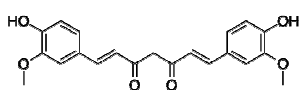
Kazinol Q



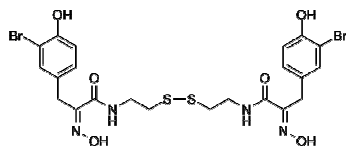
Génistéine



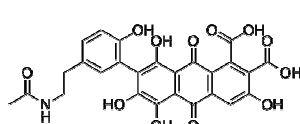
Nanaomycine A



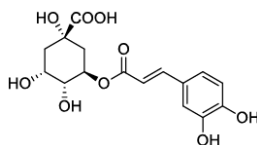
Curcumin



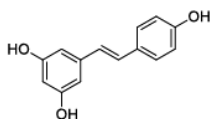
Psammapline A



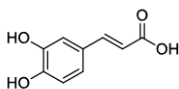
Acide laccaïque A



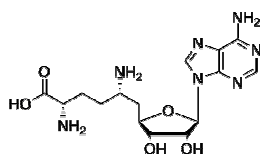
Acide chlorogénique



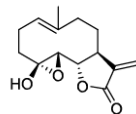
Resvératrol



Acide caféique

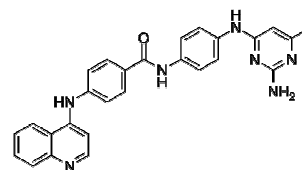


Sinéfungine

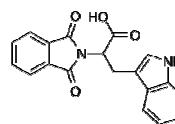


Parthénolide

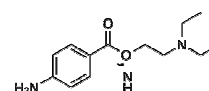
Molécules de synthèse



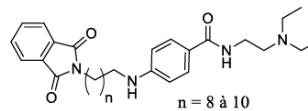
SGI-1027



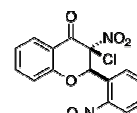
RG108



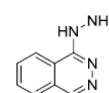
Procainamide (NH)
Procaine (O)



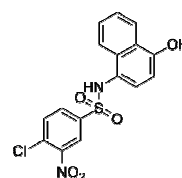
Hybride RG108-procainamide



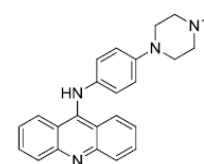
3-chloro-3-nitroflavone (69)



Hydralazine



SW155246



Dérivé acridine

Figure 23. Les inhibiteurs de DNMT non nucléosidiques.

Le **kazinol Q** [Figure 23] est un composé récemment décrit qui a été identifié comme inhibiteur de DNMT1 à partir d'un criblage, réalisé sur un échantillon de substances naturelles (Weng *et al.*, 2014). Cette molécule issu de la plante *Leycesteria formosa* a également montré sa capacité à ré-exprimer la cadhérine E dans des lignées de cancer du sein, associé à un arrêt de la prolifération cellulaire. A nouveau, l'accumulation

importante de ROS suite au traitement des cellules semble indiquer un effet sur d'autres mécanismes cellulaires en plus d'une simple inhibition de DNMT1.

La **curcumine** [Figure 23] et des dérivés ont été identifiés dans un criblage virtuel. Ils induisent une inhibition *in vitro* de la DNMT bactérienne, *M.SssI* (Liu *et al.*, 2009). Malgré l'observation d'une déméthylation dans des lignées cellulaires de prostate (promoteur de Neurog-1), aucune activité *in vivo* n'a pu être obtenue (Burgos-Moron *et al.*, 2010).

La **psammapline A** [Figure 23] est un composé extrait d'éponges marines. Ce produit a montré une capacité à inhiber plus d'une dizaine d'enzymes comme la topoisomérase II ou les DNMTs (Kim *et al.*, 1999 ; Shin *et al.*, 2000 ; Pina *et al.*, 2003; García *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012). Plus récemment elle a été caractérisée comme étant un inhibiteur de HDAC (Baud *et al.* 2012; Baud *et al.* 2013).

La **nanaomycine A** [Figure 23], utilisée pour ses propriétés antibiotiques, a été identifiée dans un criblage virtuel d'inhibition de DNMT1. De façon surprenante, elle n'a pas montré d'activité dans les tests enzymatiques contre DNMT1, mais elle a inhibé de façon sélective la DNMT3B. Une diminution de la méthylation globale a été observée dans des lignées de cancer du sang (HL60), du poumon (A549) et du colon (HCT116), ainsi qu'une réactivation de la transcription du gène suppresseur de tumeur *RASSF1A* (Kuck *et al.*, 2010). Sa sélectivité d'inhibition pour DNMT3B reste encore à confirmer.

La **sinéfungine** [Figure 23] est un analogue bactérien de SAM initialement isolé chez *Streptomyces griseolus*. Cette molécule inhibe de nombreuses enzymes dépendantes du SAM comme les DNMT (Borchardt, 1980 ; Schluckebier *et al.*, 1997). Son manque de sélectivité en fait un mauvais candidat médicament, néanmoins ce compétiteur SAM est principalement utilisé comme un bon outil dans des études mécanistiques (Lin *et al.*, 2012).

L'**acide laccaïque A** [Figure 23] est un ancien colorant alimentaire extrait d'insectes (Sako *et al.*, 1978). Ce composé a montré un pouvoir d'inhibition, lors d'un criblage à haut débit, de l'enzyme DNMT1 tronquée à laquelle il manquait le domaine TRF et le domaine CXXC (621-1600) (Fagan *et al.*, 2013). L'activité mesurée s'est ensuite révélée 30 fois moins importante sur une DNMT1 incluant le domaine TRF. De plus, aucune déméthylation cellulaire n'a pour l'instant été mesurée.

D'autres composés naturels, comme l'**acide caféique** et l'**acide chlorogénique** [Figure 23], sont des polyphénols naturels capables d'inhiber DNMT1 et *M.SssI* (Lee *et al.*, 2006). Le **parthénolide** issu de la grande camomille *Tanacetum parthenium* (Fagan *et al.*, 2013), ou encore le **resvératrol**, un composé de la classe des stilbènes issu de certains fruits (Qin *et al.*, 2014), ont également été décrits comme des inhibiteurs de DNMTs. Néanmoins, des résultats contradictoires et surtout le manque de sélectivité de ces composés en font de très mauvais candidats médicaments (Singh *et al.*, 2013).

ii. Les molécules de synthèse

La **procaïnamide** et la **procaïne** [Figure 23] ont été identifiées comme de potentiels agents déméthylants par le biais de leurs effets secondaires observés au cours de leur utilisation comme antiarythmique et anesthésique (Cornacchia *et al.*, 1988). Une étude a mis en évidence leur affinité pour les CpG hémi-méthylés et caractérisé ces molécules comme des ligands de l'ADN bloquant l'action de la DNMT1 (Villar-Garea *et al.* 2003). Cependant aucune déméthylation n'a pu être vérifiée sur un panel de lignées cellulaires (Chuang *et al.*, 2005).

Un criblage virtuel a mis en évidence le **RG108** [Figure 23] comme un inhibiteur de DNMT1 (Brueckner *et al.* 2005). Cependant, Suzuki *et al.* ont montré que ce composé inhibe la DNMT1 *in vitro* à 34% à une dose de 1mM (Suzuki *et al.*, 2010). Ce résultat a été confirmé par une autre étude qui établit la concentration à laquelle le RG108 induit 50% d'inhibition (IC₅₀) de la DNMT1 et de DNMT3A/3L à plusieurs centaines de micromolaires (Halby *et al.*, 2012 ; Asgatay *et al.*, 2014). Le mécanisme d'action de cette molécule qui induit de la déméthylation *in cellulo* (Brueckner *et al.*, 2005), mais peut-être pas par une inhibition directe des DNMTs, reste encore à élucider.

Un composé « **hybride RG108-procaïnamide** » a montré une activité 50 fois plus puissante que ses composés parents et une cytotoxicité à des concentrations de l'ordre du micromolaire sur les lignées cancéreuses DU145 et HCT116 (Halby *et al.*, 2012). Une étude de modélisation moléculaire a mis en évidence une capacité de la molécule à interagir à la fois avec l'ADN et avec l'enzyme (Yoo *et al.*, 2013).

Le **SGI-1027** [Figure 23] fut initialement synthétisé au sein d'une série chimique connue pour être de forts ligands du petit sillon de l'ADN. Cette molécule s'est démarquée par le fait qu'elle ne se lie que faiblement aux séquences A-T riches, tout en gardant une bonne stabilité dans les milieux physiologiques. La molécule inhibe les 3

DNMTs *in vitro* et entraîne également une déméthylation et une ré-expression de *TIMP3* et *CDKN2A* dans des lignées cellulaires de cancers du colon (Datta *et al.*, 2009). D'autres, dérivés ont été synthétisés par la même équipe mais aucun n'a été plus actif que le SGI-1027 (Gamage *et al.*, 2013). Récemment, notre équipe a également synthétisé 25 nouveaux dérivés de cette molécule, dont 4 se sont révélés aussi actifs que la molécule originelle (Valente *et al.*, 2014 ; Rilova *et al.*, 2014, Annexe 2) avec une sélectivité pour DNMT3A.

En plus de ces molécules, deux sous-familles de flavonoïdes ont été identifiées comme inhibitrices de DNMT lors d'un criblage de 116 composés sur le complexe catalytique murin Dnmt3A/3L. La molécule **3-chloro-3-nitroflavone** (molécule **69**) [Figure 23] s'est révélée être la molécule la plus puissante avec une activité *in-vitro* submicromolaire (Ceccaldi *et al.*, 2011). Cette famille de composés a également montré une activité remarquable lors de tests sur des embryons de zebrafish, avec un phénotype identique à la 5azadC.

Cette liste n'est pas exhaustive car d'autres molécules de synthèse ont été identifiées comme de potentiels inhibiteurs de DNMTs (Erdmann *et al.*, 2015c) comme l'**hydralazine**, mais qui s'est révélé être plutôt un inhibiteur de G9a (Zambrano *et al.*, 2005), le **SW155246**, qui présente une activité 30 fois supérieure sur DNMT1 par rapport à DNMT3A (Kilgore *et al.*, 2013), et aussi des **dérivés d'acridine** connus pour être des intercalants de l'ADN (Hossain *et al.*, 2013). Pour ces derniers, des études plus approfondies sont encore nécessaires pour évaluer leur sélectivité éventuelle pour les séquences CpG.

Dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques des DNMTs, notre équipe a également réalisé un criblage à haut débit de 66.000 composés chimiques basé sur une inhibition enzymatique de la partie catalytique de la DNMT3A. Une famille de dérivés de propiophénone a ainsi été identifiée. Après une optimisation chimique, sur la base de relations structure-activité, un nouvel inhibiteur a été obtenu avec une EC₅₀ de 2.1 µM (Erdmann *et al.*, 2015a, Annexe 3).

Enfin, le **MG98**, un **oligonucléotide anti-sens** d'une vingtaine de paires de bases, qui cible spécifiquement la partie 3' non traduite de la DNMT1 humaine et empêche ainsi sa traduction, a également été décrit (Amato 2007). Cette molécule possède une spécificité de séquence sélective de la DNMT1 et n'empêche donc pas la traduction des DNMT3A et

DNMT3B. Une déméthylation et une ré-expression de *CDKN2A* dans des lignées tumorales de colon et de vessie ont été mise en évidence (Goffin and Eisenhauer 2002). Cependant, lors d'un essai clinique de phase I dans des MDS et AML, la ré-expression de gènes comme *WIT1* ou encore *CDKN2B* sans corrélation avec une déméthylation, remet en question le lien direct entre le traitement par la molécule et la ré-expression de ces gènes suppresseurs de tumeurs (Klisovic *et al.*, 2008).

2.3. Quelles perspectives pour les inhibiteurs de DNMTs ?

Comme nous venons de le décrire, de nombreuses molécules ont fait l'objet d'études sur l'inhibition des DNMTs. Les inhibiteurs de type nucléosidiques sont les plus efficaces. Parmi cette famille, la 5azaC (Vidaza) et 5azadC (Dacogen) sont les seuls inhibiteurs mis sur le marché pour des traitements anticancéreux, ce qui valide le concept épigénétique comme une cible dans la lutte contre le cancer. Ces molécules font ainsi office de référence en tant qu'agent déméthylant. Cependant, leur instabilité chimique, leur manque de sélectivité, mais surtout leur incorporation dans l'ADN (et l'ARN pour la 5azaC) et leur capacité à induire des dommages à l'ADN, sont des barrières majeures pour des traitements à long terme des patients. Tout cela oriente donc les recherches vers la découverte d'inhibiteurs non-nucléosidiques stables n'induisant pas d'effets secondaires toxiques.

Par ailleurs, de nombreux essais cliniques ont évalué les bénéfices thérapeutiques obtenus par un traitement d'inhibiteurs de HDAC combiné à des inhibiteurs de DNMT (Griffiths and Gore, 2008; Yacoub-Usman *et al.*, 2012). Les résultats obtenus ont montré que, les effets relativement modestes d'inhibiteurs de HDAC sur des syndromes myélodysplasiques ont été considérablement augmentés par le traitement conjoint d'inhibiteurs de DNMTs. De plus, des observations similaires ont aussi été constatées sur des tumeurs solides (Juergens *et al.*, 2011).

Les inhibiteurs non nucléosidiques décrits à ce jour sont encore insuffisamment efficace. En effet, la majorité d'entre eux n'a tout simplement pas réussi à engendrer une déméthylation dans les cellules cancéreuses. Seule l'hydralazine a fait l'objet d'une étude clinique de phase I (Zambrano *et al.*, 2005), et seuls le SGI1027 et la série 3-chloro-3-nitroflavone semblent être aujourd'hui les molécules les plus prometteuses en recherche.

Finale­ment, la DNMT1 est la seule qui est toujours exprimée, ce qui explique qu'elle soit souvent la cible de choix, son inhibition entraînant une mort complète des cellules (Chen *et al.*, 2007). Cependant, certains cancers montrent aussi une surexpression soit de la DNMT3A soit de la DNMT3B (Robertson *et al.*, 1999), incitant à la conception d'inhibiteurs plus puissants et sélectifs de chaque isoforme (Erdmann *et al.*, 2015b, Annexe 4). En effet, ceux-ci permettraient de subvenir, à la fois, aux besoins thérapeutiques actuels et fourniraient également de nouveaux outils dans la compréhension des mécanismes épigénétiques.

OBJECTIF DE LA THESE

L'épigénétique, de part son caractère réversible et la méthylation de l'ADN en particulier sont une cible thérapeutique intéressante dans les cancers. Seuls deux analogues de nucléosides présentent une activité déméthylante de l'ADN au niveau cellulaire (la azaC et la 5azadC), mais ils présentent également de nombreux désavantages dont une forte instabilité dans les milieux physiologiques et une absence de sélectivité. Ces produits nécessitent également une étape d'incorporation dans l'ADN. C'est pourquoi notre équipe s'intéresse à l'identification et la caractérisation pharmacologique d'inhibiteurs non-nucléosidiques des DNMTs.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont donc été réalisés autour d'un objectif principal de **découverte et de caractérisation des conséquences cellulaires de nouveaux inhibiteurs de méthyltransférases d'ADN** développés au laboratoire.

Nous avons basé nos études sur des molécules hits issus du criblage de la chimiothèque et extractothèque des laboratoires Pierre Fabre et d'autres collaborations (LSPCMIP, ICSN...).

Dans le but de caractériser pharmacologiquement ces molécules, j'ai mis en place au laboratoire de **nouvelles méthodologies** permettant de caractériser à la fois la méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes, dans des cellules cancéreuses, mais aussi les marques des histones et le recrutement de facteurs de transcription sur une même séquence promotrice (Deuxième partie, chapitre 4). J'ai développé et utilisé en particulier pour cela un **système cellulaire KG1 CMV-Luc** (Chapitre 4, § 1.2) que nous avons également utilisé pour guider les chimistes dans l'optimisation des composés et les études de relation structure activité (SAR).

J'ai aussi réalisé un travail important dans l'**exploration de la cinétique d'action** des composés (Chapitre 5, § 1.2, [Menon et al., soumis pour publication, Figure 3](#)).

Nous avons ainsi découvert une **nouvelle série chimique** intéressante qui fait l'objet de deux brevets qui ont été déposés le 02.10.2015 ([Menon et al., EP15306556.0](#) ; [Menon et al., EP15306555.2](#)). D'autres séries hits ont également été identifiées au cours de ce criblage. Elles ont ensuite été caractérisées pour leurs propriétés biologiques et restent encore à améliorer ([Rilova et al., 2014](#) ; [Erdmann et al., 2015a et 2015b](#) ; [Annexes 2, 3 et 4](#)).

Les méthodologies que j'ai mises en place m'ont permis d'approfondir, en particulier, les **mécanismes d'action de deux séries chimiques**. J'ai ainsi étudié, dans un premier temps, des composés de type 3-chloro-3-nitroflavones (Chapitre 5, § 1.2, [Menon *et al.*, soumis pour publication](#)), puis dans un deuxième temps, une série chimique de type bi-substrats (Chapitre 5, § 2.2, [Halby *et al.*, en préparation](#)).



DEUXIEME PARTIE

METHODOLOGIE

Chapitre 4 – Mesurer l'inhibition des DNMTs

1. Deux tests pour un criblage HTS

L'inhibition des DNMTs peut se mesurer à l'aide de tests enzymatiques ou à l'aide de tests cellulaires, en mesurant la réexpression d'un gène conditionnée à une déméthylation de sa séquence promotrice. En 2012, dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs de DNMTs, notre équipe a entrepris le criblage d'une banque de 60.000 molécules et près de 15.000 extraits naturels de la chimiotèque des Laboratoires Pierre Fabre. Le choix a été fait de réaliser ce criblage à la fois sur un test enzymatique d'inhibition de DNMT3A et également sur un test cellulaire dans la lignée leucémique humaine KG1. Ce dernier est basé sur la ré-expression du gène de la luciférase Firefly (Luc+) conditionné à une déméthylation du promoteur du cytomegalovirus (CMV).

1.1. Un test enzymatique d'inhibition de DNMT3A

1.1.1. Principe du test enzymatique

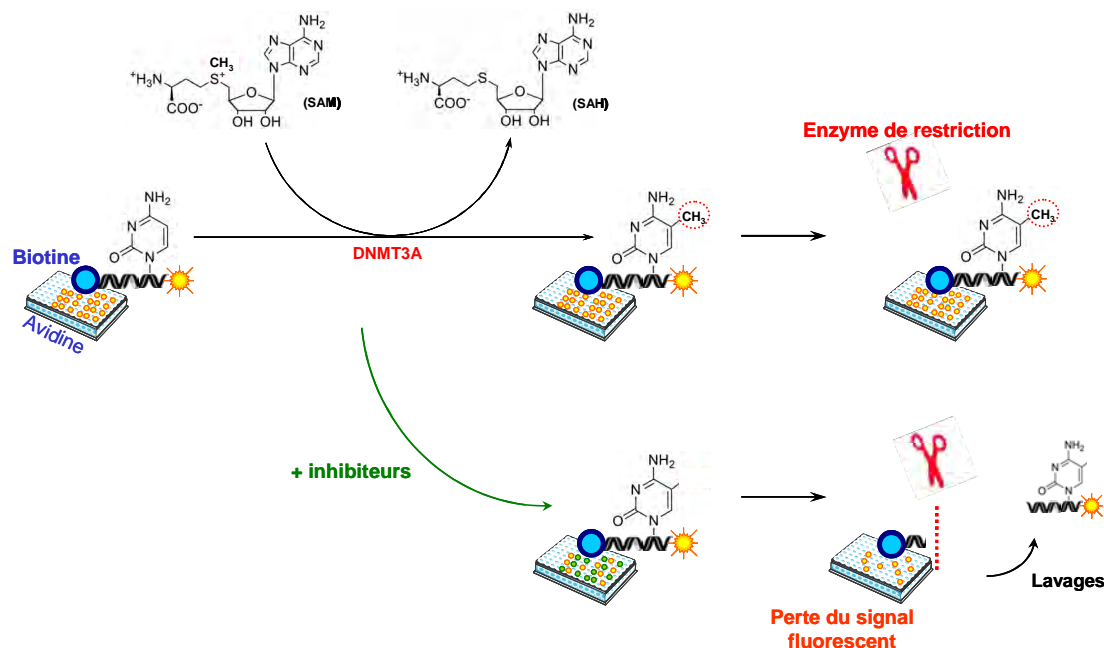


Figure 24. Test enzymatique d'inhibition de DNMT3A.

Le test mis en place au laboratoire est basé sur la mesure de la perte d'un signal fluorescent en présence d'inhibiteurs catalytiques. La réaction de méthylation a lieu sur un duplexe d'ADN, immobilisé dans une plaque-support à l'aide d'un couplage biotine/avidine. Ce duplexe porteur d'un fluorophore est méthylé par la partie catalytique (624-912) de la DNMT3A humaine (DNMT3A-C) dans un milieu réactionnel contenant du SAM. Une enzyme de restriction sensible à la méthylation est ensuite ajoutée pour couper le duplex d'ADN au niveau de son site de reconnaissance seulement si celui-ci est non-méthylé.

1.1.2. Protocole expérimental

Le test que nous avons utilisé [Figure 24] est basé sur l'utilisation d'une enzyme de restriction sensible à la méthylation de l'ADN. Il a été développé par Ceccaldi *et al.* (Ceccaldi *et al.*, 2011) et réalisé dans notre laboratoire par V. Masson et J.-M. Grégoire.

Les molécules à tester sont dissoutes dans 100% DMSO pour obtenir des solutions stocks à 10mM.

Une première étape consiste à préparer des plaques contenant le duplexe d'ADN. Pour cela, les puits d'une plaque 384-puits (Optiplate noires, PerkinElmer, France) sont incubés avec 70µL d'avidine (SigmaAldrich, France) concentrée à 10µg/mL dans 0,1M de bicarbonate de sodium pH 9,6 sur la nuit à +4°C. La plaque est ensuite lavée 5 fois avec 100µL de PBS contenant 0,05% de Tween-20 et 500mM NaCl (PBST + NaCl), puis 3 fois par du PBST. Enfin, 60µL d'oligonucléotides (FAM-5'-GCTATATATACGTACTGTGAACCCTACCAGACATGCACTG-3' et BIOT-5'-CAGTGCATGTCTGGTAGGGTTCACAGTACGTATATATAGC-3', Eurogentec, Belgique) à 0,05µM sont incubés pendant 1h à T.A. dans du PBST. Cet oligonucléotide, marqué en 3' par une 6-carboxyfluorescéine, contient un unique site CpG qui fait partie de la séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction sensible à la méthylation, HpyCH4IV.

Une deuxième étape consiste ensuite à réaliser la réaction enzymatique en présence de chaque molécule à tester. Pour cela, 100nM de DNMT3A-C, 20µM de SAM et la molécule à tester (jusqu'à 1% final en DMSO) sont ensuite incubés 1h à 37°C dans 50µL de tampon de méthylation (1mM EDTA, 50mM KCl, 1mg/mL BSA dans 20mM HEPES pH 7,2). La DNMT3A-C correspond à la partie catalytique (a.a 624-912) de la protéine humaine comme cela a été décrit par Jeltsch *et al.* (Jeltsch *et al.* 1998). Elle a été clonée puis purifiée selon le protocole de Jia *et al.* (Jia *et al.*, 2007) à l'aide d'un tag histidine à partir d'un culot d'expression bactérien (Gros *et al.*, 2013, Annexe 1). Après 1h d'incubation à 37°C, chaque puit est lavé 3 fois avec 100µL de PBST + NaCl, puis 3 fois avec 100µL de PBST. Chaque puit subit ensuite une restriction enzymatique par ajout de 5U de HpyCH4IV (New England Biolabs, France) dans 50µL de tampon préconisé par le fournisseur (NEBuffer 1) pendant 1h à 37°C. La restriction est arrêtée par 3 lavages avec du PBST contenant 500mM de NaCl, puis 3 lavages avec du PBST.

Enfin, une dernière étape consiste à mesurer la fluorescence dans du PBS sur un lecteur de microplaque EnVision™ Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, France). Les pourcentages d'inhibition (% Inh) sont calculés selon la formule suivante : $\% Inh = 100 - (100 * Y/X)$, avec X le signal obtenu en présence du DMSO et Y le signal obtenu en présence de l'inhibiteur. La concentration efficace médiane (EC₅₀), à laquelle on observe 50% de l'inhibition maximale du composé, est déterminée par l'analyse de plusieurs concentrations de produit, en duplicats. Les points sont analysés avec une régression non-linéaire sigmoïdale à pente variable réalisée sur GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software). Lorsqu'un composé possède une courbe dose-

réponse qui varie de 0% à 100%, l' EC_{50} est égale à la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), à laquelle on observe 50% d'inhibition.

1.2. Un test cellulaire : KG1 CMV-Luc

De nombreux tests cellulaires en HTS ont été mis au point en se basant sur des clones sélectionnés pour leur capacité à exprimer un gène rapporteur lorsqu'ils sont traités par des drogues ciblant l'épigénétique. Plus précisément, un gène rapporteur comme la *GFP* peut être placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif « éteint » par régulation épigénétique, comme par exemple CMV (Johnson *et al.* 2008 ; Si *et al.* 2010). Cette approche a permis de réaliser avec succès le criblage de petites ou moyennes chimiothèques (d'une centaine à quelques centaines de milliers de molécules). Ce type de test nécessite cependant de nombreux tests secondaires afin de déterminer précisément le(s) mécanisme(s) d'action de la molécule (inhibiteur de HMT, de DNMT, dommages à l'ADN...) (Best *et al.* 2011; Lin *et al.* 2011; Tran *et al.* 2014).

1.2.1. Principe du test cellulaire

Afin de mesurer une activité cellulaire des composés identifiés *in-vitro*, sur le test enzymatique, nous avons évalué leur capacité à réactiver un système rapporteur épigénétique intégré de façon stable dans la lignée leucémique humaine KG1. Ce système rapporteur consiste en un promoteur CMV méthylé (Chapitre 4, § 3.1.1, Figure 28) contrôlant l'expression du gène de la luciférase [Figure 25]. Le traitement par un inhibiteur de la méthylation de l'ADN permet de déméthyle le promoteur CMV et d'induire l'expression de la luciférase, qui peut être quantifiée par détection de la luminescence [Figure 25].

Nous avons utilisé la 5azadC dans tous nos essais expérimentaux, comme contrôle positif d'inhibition de la méthylation. Par ailleurs, pour identifier les molécules induisant une ré-expression de la luciférase, nous avons choisi un seuil de facteur d'induction (FI) de 2.0, en-dessous duquel l'effet sur le système rapporteur est négligeable.

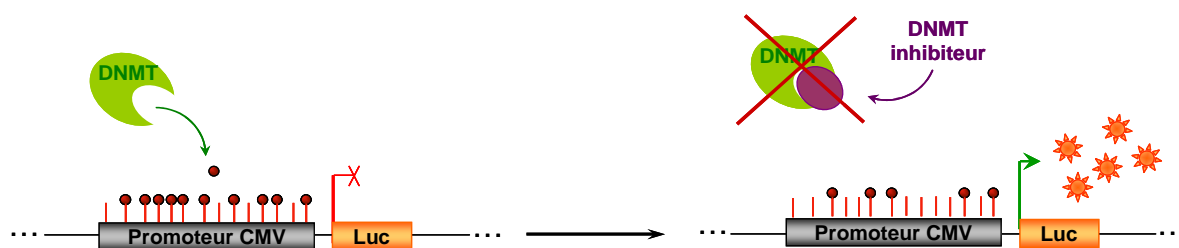


Figure 25. Système rapporteur CMV-Luc dans les cellules KG-1.

La méthylation du promoteur CMV est représentée par les cercles rouges symbolisant un CpG méthylé et les bâtons rouges un CpG non méthylé. La flèche barrée représente la répression de la luciférase contrôlée par le promoteur CMV méthylé. En présence d'un inhibiteur de DNMT, la méthylation du promoteur diminue, rétablissant une expression de la luciférase contrôlée par le promoteur CMV déméthylé.

1.2.2. Protocole expérimental

Dans un premier temps, la lignée leucémique humaine KG1 (ATCC, USA), a été transfectée de façon stable avec le gène rapporteur de la luciférase Firefly (Luc+, plasmide pGL3 de Promega) mis sous le contrôle du promoteur CMV (plasmide pEGFP-N1, Clontech) partiellement méthylé. Les cellules transfectées ont été sélectionnées par ajout de 0,5mg/mL de généticine (Life Technologies) dans le milieu de culture, le gène de résistance à cet antibiotique étant présent sur le transgène, cela a permis son intégration au sein du génome des cellules. Les cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO₂ dans du milieu RPMI-1640 (Lonza) supplémenté de 2,1mM de L-Glutamine, de 25mM de HEPES (Lonza), de 10% de sérum de veau fœtal inactivé (Lonza) et de 0,5mg/mL de généticine (Life Technologies). J'ai établi cette lignée KG1-CMV-Luc en 2008 dans l'équipe d'Oncologie Expérimentale des Laboratoires Pierre Fabre, dans le cadre de la mise en place d'un panel de lignées tumorales luminescentes, pour une plate-forme d'imagerie *in-vivo* (Pesnel *et al.*, 2011 ; Pesnel *et al.*, 2012). Le clone que nous avons utilisé pour notre test a été sélectionné pour sa très faible luminescence basale. La méthylation du promoteur CMV a également été mesurée avec une valeur moyenne de 45% (Chapitre 4, § 3.1.1). Dans notre test, des plaques 96-puits sontensemencées avec 20 000 cellules par puit. Après 24h d'incubation en présence du composé à tester ou du DMSO, l'induction du promoteur est mesurée par quantification de la luciférase grâce au système ONE-Glo™ Luciferase (Promega) selon le protocole du fournisseur. La luminescence est mesurée sur un lecteur de microplaque EnVision™ Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) et les données sont exprimées en facteur d'induction comparé au contrôle DMSO. Les traitements de la lignée KG1-CMV-Luc ont été réalisés conjointement avec V. Poughon-Cassabois et Y. Aussaguès.

Pour l'étude de la cytotoxicité, les cellules KG1-CMV-Luc, sont ensemencées à une concentration de 200 000 cellules par mL. Après 24h d'incubation en présence ou non du

composé à tester, le pourcentage de viabilité est réalisé par coloration des cellules au bleu trypan suivi d'un comptage à l'aide d'un compteur automatique Vi-Cell XR (Beckman Coulter).

Même si ces tests primaires ne sont qu'une première étape pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de DNMTs, le criblage réalisé par notre équipe a permis de d'identifier plusieurs séries de molécules cibles servant de points de départ dans la synthèse chimique de nouveaux inhibiteurs (Erdmann *et al.*, 2015a et 2015b, Annexes 1 et 2). L'optimisation de ces molécules a été guidée ensuite, par leur capacité à déméthylater l'ADN au niveau cellulaire, mais aussi pour les molécules les plus actives, par l'analyse d'une ré-expression effective de TSG. Cela dans le but d'induire une reprogrammation des cellules tumorales. Ces analyses complémentaires restant indispensables pour caractériser le mode d'action des nouveaux inhibiteurs ainsi identifiés.

C'est dans ce contexte que j'ai donc mené mon travail de thèse en étroite collaboration avec les chimistes de synthèse.

De plus, une grande partie de mon travail a consisté à la mise au point de techniques permettant de mesurer la méthylation de l'ADN.

2. Analyse de la méthylation de l'ADN au niveau de promoteurs de Gènes Suppresseurs de Tumeurs

2.1. Lignées cellulaires utilisées et traitements

La lignée leucémique KG-1 (ATCC, USA) est cultivée comme décrite précédemment (Chapitre 4 § 1.2.2). La lignée Karpas299 issue d'un lymphome à large cellule est cultivée dans les mêmes conditions. La lignée HCT116 de cancer du colon est cultivée à 37°C, 5% CO₂ dans du milieu MEM glutamax supplémenté de 2,1mM de L-Glutamine, de 25mM de HEPES et de 10% de sérum de veau fœtal inactivé.

Les cellules sontensemencées à 0,2x10⁶ cellules/mL dans 10mL de milieu de culture correspondant, en flacon de culture 25cm² (Corning, France), traitées et récoltées selon le schéma présenté à la [Figure 26]. Nous avons établi ce schéma de traitement en nous basant sur les travaux réalisés par Suzuki *et al.*, en 2004 et Tsai *et al.*, en 2012, qui montrent une meilleure déméthylation au cours du temps lorsque des cellules sont traitées respectivement avec un siRNA ciblant DNMT1 ou la 5azadC.

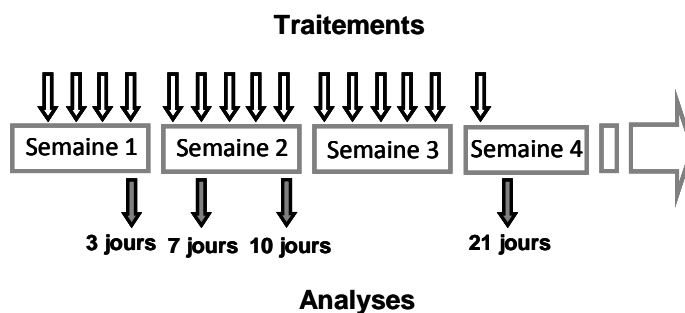


Figure 26. Chronogramme des traitements et analyses cellulaires.

Les flèches blanches indiquent les jours de traitements des cellules avec les composés à évaluer, tandis que les flèches grises correspondent aux jours où les cellules sont récupérées pour analyse. Les cellules sont traitées tous les jours, excepté deux jours entre chaque semaine.

2.2. La conversion de l'ADN par le bisulfite de sodium

i. Réaction chimique

Afin d'étudier l'état de méthylation de l'ADN au niveau de promoteurs de TSG, nous avons utilisé plusieurs techniques permettant de différencier une cytosine méthylée d'une cytosine non méthylée. Il existe de nombreuses techniques d'analyse de la méthylation de l'ADN (Fraga and Esteller, 2002), toutes basées sur une étape de conversion de l'ADN par un traitement au bisulfite de sodium suivie d'une étape de désulfonation [Figure 27].

Cette réaction chimique consiste tout d'abord en la sulfonation en position 6 d'une cytosine, formant ainsi un sulfonate de cytosine. Puis une désamination hydrolytique a lieu en présence d'eau, conduisant à un sulfonate d'uracile, converti en uracile lors d'une étape de dé-sulfonation (Clark *et al.*, 1994). **Cette réaction chimique ne peut pas avoir lieu sur une cytosine méthylée en position 5.** Elle permet donc de **différencier les cytosines non méthylées, transformées en uracile, des cytosines méthylées qui restent intactes.**

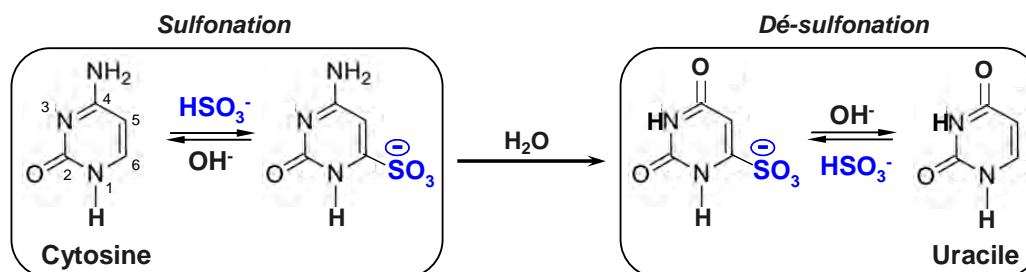


Figure 27. Conversion d'une cytosine en uracile par le bisulfite de sodium.

Les techniques basées sur cette réaction ne permettent pas de différencier les 5mC des 5hmC, celles-ci n'étant pas converties en uracile lors de la réaction. Les 5hmC étant présentes en plus faible quantité ceci n'est pas critique pour nos mesures.

Dans toutes les techniques développées par la communauté scientifique, cette conversion est généralement suivie d'une étape d'amplification par PCR. Les brins d'ADN néo-synthétisés présentent donc, soit une thymine à la place de l'uracile correspondant à une cytosine non méthylée au départ, soit une cytosine à la place d'une cytosine méthylée. Ces techniques permettent **l'analyse d'un seul CpG à des dizaines de CpGs**, voire d'établir le **méthylome du genome entier** (Laird, 2010) [Tableau 5].

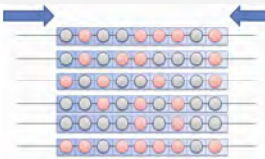
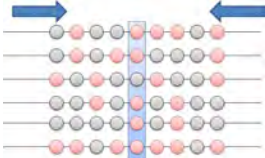
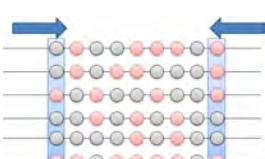
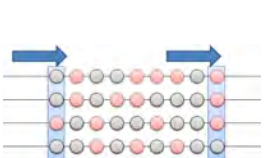
Technique	Nombre de CpG analysés	Précision de l'analyse	+ / -	Références
BCS	≈ 10-30 CpG		+ Analyse clone par clone et CpG par CpG - Clonage Bas débit	Clark <i>et al.</i> , 1994
COBRA	≈ 1-3 CpG		+ Moyenne des clones, CpG par CpG - Semi-quantitatif Peu de CpG	Xiong and Laird, 1997
MSP	≈ 1-2 CpG		+ Moyenne des clones, CpG par CpG - Semi-quantitatif Peu de CpG	Herman <i>et al.</i> , 1996a Ku <i>et al.</i> , 2011
Puces méthylome (Illumina)	Génome entier (≈ 17 CpG / locus)		+ Moyenne des clones, CpG par CpG - Semi-quantitatif Peu de CpG	Laird <i>et al.</i> , 2010 Bibikova <i>et al.</i> , 2011 Touleimat and Tost, 2012

Tableau 5. Les différentes méthodes utilisées pour nos analyses de la méthylation de l'ADN (après conversion au bisulfite de sodium).

Dans ce tableau, l'ADN est représenté par une ligne noire, les CpG méthylés par les sphères rouges et les CpG non méthylés par les sphères grises. Les flèches bleues représentent les oligonucléotides utilisés pour amplifier les locus à analyser. Les rectangles bleus représentent les différents types d'analyses. Tableau adapté de (Mikeska *et al.*, 2010).

ii. Protocole expérimental

Dans nos expériences, les cellules sont récoltées après traitement, par centrifugation (4°C, 1200rpm, 5min), puis lavées 2 fois au PBS. L’ADN génomique est ensuite extrait selon le protocole du kit DNeasy kit (Qiagen).

La conversion au bisulfite de sodium est ensuite réalisée selon le protocole du kit EZ DNA methylation Gold Kit (Proteogene), suivant les recommandations du fabricant : 98°C pendant 10min, 53°C pendant 30min, puis 8 cycles de 53°C pendant 6 min et 37°C pendant 30min. L’ADN converti est ensuite purifié et élué dans 50µL d’eau RNase/DNase free (Qiagen).

Nous allons à présent détailler quelques-unes de ces méthodes que nous avons utilisées au laboratoire au cours de cette thèse.

2.3. Les techniques utilisées

2.3.1. Le bisulfite clonage séquençage (BCS)

i. Principe du BCS

Le bisulfite clonage séquençage (BCS) est une technique qui permet d’avoir une grande finesse d’analyse tout en analysant des amplicons pouvant aller jusqu’à 500-700bp, contenant plusieurs dizaines de CpG (Clark *et al.* 1994). Après la conversion au bisulfite, l’ADN est amplifié par PCR, pour être ensuite cloné. Chaque clone représente donc un brin d’ADN amplifié par PCR. Le séquençage permet ensuite, par comparaison avec la séquence amplifiée théorique, d’identifier quelles cytosines ont été transformées en thymine, et quelles cytosines étaient méthylées. Cette technique permet d’étudier la méthylation de l’ADN, clone par clone (donc brin d’ADN par brin d’ADN) et CpG par CpG.

ii. Protocole expérimental

La région d’intérêt [Tableau 6] est amplifiée par PCR, à partir de 2,5µL d’ADN converti, en présence d’une unité de polymérase d’ADN Platinum® Taq (Life Technologies) dans le tampon du fabricant additionné de 1,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs et 200nM de chaque oligonucléotide dans un volume final de 50µL. La réaction est incubée dans un thermocycleur selon le programme suivant : 94°C pendant 2min, suivit de 35 cycles de 94°C pendant 30sec, 55°C pendant 30sec, 72°C pendant 1min, puis une dernière étape d’élongation à 72°C pendant 6min.

L’amplicon obtenu est contrôlé par électrophorèse sur gel d’agarose 2% puis introduit dans un plasmide grâce à une ligation à bout franc à l’aide du kit StrataClone Blunt PCR Cloning Kit

(Agilent). La transformation est réalisée dans des bactéries *E. coli* compétentes (StrataClone Solo pack, Agilent), par un choc thermique à 42°C pendant 45sec, suivi de 2min dans la glace. Une expression phénotypique est réalisée pendant 1h d'incubation à 37°C, sous agitation, dans 250µL de SOC. (Life Technologies). Les bactéries ainsi transformées sont étalées sur des boîtes contenant un gel de LB/Agar/Ampicilline/XGal (Fast-Media Amp XGal Agar, Invivogen), puis incubées sur la nuit à 37°C.

Les colonies ne digérant pas le XGal (blanches) sont prélevées et mises en solution dans 30µL d'eau. Une PCR d'amplification est ensuite réalisée sur 1µL de cette suspension bactérienne, avec 0,625U de polymérase AmpliTaq® Gold (Life Technologies) dans le tampon fourni additionné de 2,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 320nM d'oligonucléotides M13 sens (GTAAAACGACGGCCAG) et anti-sens (CAGGAAACAGCTATGAC) pour un volume final de 20µL. La réaction est incubée dans un thermocycleur selon le programme suivant : 95°C pendant 10min, puis 35 cycles de 95°C pendant 45sec, 55°C pendant 45sec, 72°C pendant 1min, suivis d'une étape d'élongation à 72°C pendant 10min.

Un aliquot de 8µL du produit de PCR est ensuite purifié sur P100 (Bio-Gel® P-100, Bio-Rad Laboratories) avant de subir une réaction de séquence. Pour la réaction de séquence, 4µL de produit purifié est incubé en présence de 0,3µM d'oligonucléotide M13 sens et 1X de BigDye terminator v3.1 (BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit, Life Technologies) dans le tampon fourni pour un volume final de 11µL. La réaction est incubée dans un thermocycleur selon le programme suivant : 96°C pendant 1min, 25 cycles de 96°C pendant 10sec, 50°C pendant 10sec et 60°C pendant 4min.

Les séquences sont alors purifiées sur résine Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich). 5µL de formamide (Life Technologies) sont ajoutés et les séquences sont lues sur un séquenceur 3130XL Applied Biosystem (Life Technologies).

Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel Bisulfite Sequencing Methylation Analysis (BISMA) (Rohde *et al.*, 2010) disponible sur la plateforme d'analyse de la méthylation d'ADN Bisulfite Sequencing Data Presentation and Compilation (BDPC) (services.abc.uni-stuttgart.de/BDPC/index.php) en utilisant les critères proposés par défaut.

2.3.2. L'analyse par restriction combinée au bisulfite (COBRA)

i. Principe du COBRA

La technique d'analyse par restriction combinée au bisulfite (COmbined Bisulfite Restriction Analysis ou COBRA) permet de différencier les thymines des cytosines après conversion au bisulfite et PCR grâce à une enzyme de restriction (Xiong and Laird, 1997 ; Brena *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation d'une enzyme de restriction dont le site de

reconnaissance contient un site CpG différencie les deux nucléotides en coupant ou non l'ADN après l'étape de conversion et d'amplification par PCR. Il est donc possible d'évaluer la méthylation moyenne des cellules sur quelques CpG précis.

ii. Protocole expérimental

La région d'intérêt [Tableau 6] est amplifiée par PCR, à partir de 100ng d'ADN traité au bisulfite de sodium, en présence de 1,25 unités de polymérase EpiTaq HS (Takara) dans le tampon du fabricant additionné de 2,5mM de MgCl₂, 300μM de dNTPs et 400nM de chaque oligonucléotide dans un volume final de 50μL. La réaction est incubée dans un thermocycleur selon le programme suivant : 40 cycles de 98°C pendant 10sec, 55°C pendant 30sec, 72°C pendant 30sec.

La taille de l'amplicon obtenu est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% puis 20μL sont digérés dans un volume final de 30μL avec 2 unités de l'endonucléase de restriction BsiEI (site de coupure : CGRY|CG) dans le tampon Cutsmart recommandé par le fabricant (New England Biolabs) pendant 90min à 60°C.

Le produit de la digestion est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et chaque bande obtenue est quantifiée à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad Laboratories). Les bandes coupées correspondent à l'ADN méthylé et la bande de l'amplicon de départ non digéré à l'ADN non méthylé. La formule suivante est utilisée pour calculer une valeur de déméthylation entre un échantillon correspondant à des cellules traitées avec un inhibiteur, et l'échantillon contrôle correspondant aux cellules non-traitées: $\text{Déméthylation (\%)} = 100 - (\text{méthylation des cellules traitées} \times 100 / \text{méthylation des cellules non-traitées})$.

2.3.3. La methyl-spécific PCR (MSP)

i. Principe de la MSP

La methyl-spécific PCR (MSP) a lieu immédiatement après la conversion au bisulfite (Herman *et al.* 1996a ; Ku *et al.* 2011). Il s'agit en fait de comparer l'amplification obtenue avec des amorces possédant un site CpG dans leur séquence : soit l'amorce contient un TpG (amorces nommées U pour Unmethylated) pour correspondre à un CpG non méthylé, soit l'amorce contient un CpG (amorces nommées M pour Methylated), ce qui correspond à un CpG méthylé. Tout comme le COBRA, la MSP nous permet d'analyser la méthylation moyenne des cellules sur quelques CpG précis.

ii. Protocole expérimental

500ng de chaque échantillon d'ADN ainsi que des échantillons contrôles commerciaux correspondant à de l'ADN méthylé par M.SssI et à de l'ADN non méthylé (Zymo Research) sont traités au bisulfite de sodium comme indiqué précédemment (Chapitre 4 § 2.2.) et élués dans 30µL d'eau stérile. Les ADN contrôles sont ensuite dilués 3 fois au 1/25 dans 100µL d'eau afin d'obtenir 4 échantillons permettant de réaliser une gamme étalon d'ADN méthylés.

Dans ce test, les régions d'intérêt [Tableau 6] sont amplifiées par PCR quantitative (qPCR) suivant un protocole de MethyLight (Campan *et al.*, 2009), dans lequel des sondes de type Taqman, spécifiques de chaque amplicon, sont utilisées à la place d'un mix classique à base de SYBRGreen. Chaque réaction de PCR est préparée dans un volume final de 15µL, avec 7,5µL de KAPA SybrFast Mastermix (KapaBiosystems), 333µM de chaque couple d'oligonucléotides (ALU ou spécifiques du locus d'intérêt) et 2µL d'ADN converti au bisulfite de sodium. Des courbes étalons sont réalisées avec les amorces ALU sur les dilutions d'ADN contrôles, tandis que les ADN préparés à partir des cellules traitées avec les inhibiteurs de DNMTs sont analysés à la fois avec les couples d'oligonucléotides ALU et les oligonucléotides spécifiques du locus d'intérêt. Le SYBR Green est un agent fluorescent qui s'intercale dans l'ADN nouvellement formé lors de la PCR. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN. Elle franchit une valeur seuil fixée par l'appareil à un cycle de la PCR appelé Ct (cycle threshold) permettant de faire le calcul de la quantité initiale d'ADN. Les valeurs de méthylation sont calculées selon la formule suivante ci-dessous :

$$[(\text{CtEchantillonGene}/\text{CtEchantillonAlu})/(\text{CtSssIGene}/\text{CtSssIAlu})]*100.$$

2.3.4. Le méthylome

Afin d'établir le profil de méthylation du génome entier, l'ADN bisulfité peut être analysé sur des puces ADN comme par exemple les puces Illumina Infinium II (Bibikova *et al.* 2011; Sandoval *et al.* 2011). Ces puces sont constituées d'oligonucléotides simple brin de 50nt, immobilisés en 5' et possédant en 3' une séquence complémentaire du site en amont du CpG analysé. Une extension d'une base permet ensuite d'ajouter une base A (complémentaire de U pour un site non méthylé) ou une base G (complémentaire de C pour un site méthylé) marquées différemment, puis reconnues par deux fluorophores différents. Cette technique permet d'étudier l'ensemble du méthylome avec en moyenne 17 CpGs par gène, répartis sur chaque promoteur et corps des gènes.

2.3.5. Commentaires

Chacune de ces méthodes possède des avantages et des inconvénients (Tableau 5). Notons qu'un biais commun à nombre de ces techniques est l'étape de PCR où l'amplification peut ne pas avoir la même efficacité selon l'état de méthylation de la séquence d'ADN amplifiée. De même le clonage peut lui aussi favoriser la sélection de certains brins d'ADN, perturbant ainsi la représentativité de la technique de BCS (Warnecke *et al.* 1997 ; Warnecke *et al.* 2002). Cependant, ces biais sont particulièrement importants lors de la détermination de l'état de méthylation absolu de gènes. Dans notre cas, nous mesurons essentiellement une déméthylation relative à un contrôle, nous pouvons donc raisonnablement négliger ces biais.

Afin de caractériser l'effet de nos composés, nous avons choisi, dans un premier temps, d'établir un profil de méthylation de l'ADN à l'aide de la technique de BCS. Dans un deuxième temps, dans un souci de débit, nous avons mis en œuvre les techniques de COBRA et de MSP, qui n'analysent que quelques CpG sur une zone très restreinte du gène analysé mais permettent de traiter beaucoup plus d'échantillons. Il est important de noter que, contrairement au BCS, ces techniques ne fournissent une information que sur la moyenne des molécules d'ADN. Ainsi, si un traitement induit une déméthylation uniquement sur une sous-population cellulaire, la déméthylation mesurée sera sous-estimée par ces techniques. Enfin, nous avons également analysé l'effet déméthylant de certains de nos composés à l'aide de puces Illumina, très informatives mais au débit d'analyse très faible et qui restent encore très onéreuses.

Toutes ces techniques utilisent une étape de conversion de l'ADN, par un traitement au bisulfite de sodium, qui endommage l'ADN et affecte l'efficacité d'amplification des PCR utilisées dans les différentes techniques d'analyse. Afin de nous affranchir des problèmes d'efficacité de PCR, inhérents à cette étape de conversion, nous avons également utilisé une technique permettant une analyse directe de la méthylation (Chapitre 4 § 2.4).

2.3.6. La methyl-specific restriction qPCR (MSRqPCR)

i. Principe de la MSRqPCR

Cette technique repose sur l'analyse d'une digestion différentielle de l'ADN par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation et dépendantes de la méthylation, suivie d'une étape d'amplification de l'ADN digéré.

L'utilisation des enzymes de restriction sensibles ou non à la méthylation est une approche classique pour l'analyse de la méthylation de l'ADN (Schumacher et al., 2006 ; Zilberman and Henikoff, 2007). Les enzymes les plus connus sont les isoschizomères *HpaII* et *MspI* qui reconnaissent la séquence CCGG. *HpaII* est bloqué par la méthylation et coupe l'ADN seulement si les cytosines ne sont pas méthylées tandis que, *MspI* n'est pas sensible à la méthylation et clive quel que soit le statut des cytosines. L'ADN clivé par les enzymes de restriction est ensuite analysable par une amplification par PCR ou par PCR quantitative, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de cette méthode.

Cette technique permet ainsi une analyse directe de l'ADN génomique sans conversion au bisulfite de sodium. Elle est rapide et autorise l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Un des points faibles reste cependant le nombre limité de sites de restriction présents sur la région que l'on souhaite analyser.

Dans notre cas, nous avons utilisé cette approche pour confirmer des résultats obtenus avec les techniques précédentes (Chapitre 5 § 1.2, [Menon et al., soumis pour publication, Supplementary Figure 4](#)).

ii. Protocole expérimental

- Digestion enzymatique

Dans un premier temps, nous avons utilisé le kit commercial EpiTect Methyl II DNA Restriction (Qiagen) contenant 2 enzymes de restriction (une enzyme sensible à la méthylation et une enzyme dépendant de la méthylation). La digestion enzymatique est réalisée sur 500ng de l'ADN selon le protocole du fournisseur.

Nous nous sommes intéressés ensuite à la mise au point de notre propre technique en utilisant des enzymes de restriction connus. Pour cela, 500ng d'ADN est dilué dans 84µL de tampon de digestion CutSmart 1x (CutSmart Buffer 10x, New England Biolabs). L'ADN ainsi préparé est divisée en 3 fractions équivalentes. Dans la première fraction, aucune enzyme n'est ajoutée ce qui permet d'amplifier la quantité totale de l'ADN. La deuxième fraction est traitée avec 10 unités de l'enzyme sensible à la méthylation, *HpaII* (New England Biolabs). Cette enzyme clive

l'ADN non-méthylé et seul l'ADN méthylé non coupé pourra être amplifié dans la PCR. La troisième fraction est incubée avec 10 unités de l'enzyme *MspI* (New England Biolabs) qui coupe l'ADN méthylé et non-méthylé ce qui permet d'amplifier et d'analyser la quantité d'ADN non-digéré. La digestion enzymatique est réalisée par une incubation de 16 heures à 37°C suivie par l'inactivation des enzymes à 55°C pendant 20min.

Nous avons également testé un autre couple d'enzymes, *HhaI* et *FspEI* (New England Biolabs). Ces deux enzymes étant respectivement sensible et dépendante de la méthylation, comme les enzymes du kit commercial EpiTect Methyl II DNA Restriction (Qiagen), nous en avons reproduit le protocole dans lequel nous avons changé le tampon de digestion par le tampon CutSmart (New England Biolabs). L'incubation est effectuée de la même manière que précédemment.

- PCR en temps réel (qPCR)

La qPCR est réalisée sur l'appareil CFX384™ Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad). L'ADN digéré est mélangé dans du SsoAdvanced qPCR SYBR premix 2x (BioRad) et 25µM d'un mix d'oligonucléotides [Tableau 6] dans un volume final de 10µL. Le mélange réactionnel est chauffé à 95°C pendant 10min suivi de 3 cycles de 30 sec à 99°C et de 1min à 72°C suivie de 40 cycles de 15sec à 97°C et 1min à 72°C.

- Analyse des données

Le calcul du taux de l'ADN méthylé est effectué à partir des données de ΔCt selon les formules ci-dessous :

Enzymes utilisés	Formules
Enzymes du kit Qiagen	$F_M = 2^{-Ct(Ms)} / 2^{-Ct(Mo)} - 2^{-Ct(Msd)}$
<i>HpaII</i> et <i>MspI</i>	$F_M = 2^{-Ct(HpaII)} / 2^{-Ct(Mo)} - 2^{-Ct(Mspl)}$
<i>HhaI</i> et <i>FspEI</i>	$F_M = 2^{-Ct(HhaI)} / 2^{-Ct(Mo)} - 2^{-Ct(HhaI+FspEI)}$

F_M : fraction de l'ADN méthylé; $Ct(Ms)$: ΔCt de la digestion avec l'enzyme sensible à la méthylation ; $Ct(M_0)$: ΔCt de la digestion sans enzymes; Msd : ΔCt de la digestion avec l'enzyme sensible à la méthylation et l'enzyme dépendant de la méthylation; $Ct(HpaII)$: ΔCt de la digestion avec *HpaII*; $Ct(Mspl)$: ΔCt de la digestion avec *MspI*; $Ct(HhaI)$: ΔCt de la digestion avec *HhaI*; $Ct(HhaI+FspEI)$: ΔCt de la digestion avec *HhaI* et *FspEI*.

2.4. Régions analysées et oligonucléotides utilisées

Gènes	Séquences (5'-3') des oligonucléotides utilisés	Technique d'analyse
<i>CDKN2A</i>	F : GGT TTT TTT TAG AGG ATT TGAGG GAT AGG R : CTACCTAATTCCAATTCCTTACAAACTTC	COBRA
<i>CDKN2B</i>	F : TGAGATGGTAGAATAAAAAATTATTA R : AAACAAAAACATACCAATAAAAAAC	BCS
<i>CDKN2A</i>	F : CCAGAGGGTGGGGCGGACCGCGTGCG R : CCGACCGTAACCTATTCGGTGCCTTGG	MSRqPCR
<i>HOXA7</i>	F : TTAAAGAATTCGTTCCGCTTC R : CCAATACGAAAAATTAACCG	MSP
<i>SERPINB1</i>	F : TTTTAAGAGGTGTTATAATATGTCGT R : ATAAACGTAACCTCCGAACAACG	MSP
<i>ALU</i>	F : GGT TAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA R : ATTAAC TAACTAATCTTAACTCCTAACCTCA	MSP
<i>CDKN2A</i>	F : CATGGAGCCTTCGGCTGACT R : CCATCATCATGACCTGGATCG	RT-qPCR
<i>CDKN2B</i>	F : GCGAGGAGAACAAGGGCAT R : CCGGCTTCCAGGAGCTGT	RT-qPCR
<i>YWHAZ</i>	F : CCCTCAAACCTTGCTTCTAGGAGA R : TCATATCGCTCAGCCTGCTCG	RT-qPCR
<i>TBP</i>	F : TTGACCTAAAGACCATTGCACTTCGT R : TTACCGCAGCAAACCGCTTG	RT-qPCR
<i>CMV (S1)</i>	F : GGGGTATTAGTTTATAGTTTATATATGGA R : AATACCAAAACAACTCCCATTAAAC	NOMeSeq
<i>CMV (S2)</i>	F : GAGTTTGTTTTGGTATTAAAATTAA R : TAACCTTATACAATTACTCTCCAAC	NOMeSeq
<i>CMV (P1)</i>	F : GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG R : GGCGTTACTATGGGAACATACGTC	ChIP
<i>CMV (P2)</i>	F : GTGTATCATATGCCAAGTACGCCC R : TGTA CTGCCAAGTAGGAAAGTCCC	ChIP
<i>CMV (P3)</i>	F : ACCATGGTGATGCGGTTT R : GCCAAAACAACTCCCATTGACG	ChIP
<i>CMV (P4)</i>	F : TCAACGGGACTTTCCAA R : GCTTATATAGACCTCCACCGT	ChIP
<i>Luc + (P5)</i>	F : CAGAATCGTCGTATGCAGTGA R : ACGGTAGGCTGCGAAATGTCC	ChIP
<i>Luc + (P6)</i>	F : GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT R : ACACCTGCGTCGAAGATGT	ChIP

Tableau 6. Oligonucléotides utilisés et techniques associées.

F = Forward, R = Reverse

Dans le but de caractériser la déméthylation, induite par les molécules que nous souhaitons évaluer au niveau cellulaire, nous avons réalisé nos premières analyses sur

les lignées Karpas299 et KG-1. Deux lignées issues de patients atteints de cancers du sang, respectivement un lymphome et une leucémie, à partir desquelles nous avons analysé la séquence promotrice du gène *CDKN2B*. En effet, de multiples études rapportent la méthylation de nombreux promoteurs de gènes dans les leucémies (Kuang *et al.*, 2008), tels que *CDKN2A* (Esteller, 2003), *CDKN2B* (Herman *et al.*, 1996b ; Esteller, 2003), *p73* (Corn *et al.*, 1999 ; Esteller *et al.*, 2001) et *CDH1* (Melki *et al.*, 2000 ; Gutierrez *et al.*, 2003). La déméthylation de ces gènes par la DAC est décrite par ailleurs, et cela est généralement corrélé à une réexpression au niveau de l'ARNm.

Dans un deuxième temps nous avons voulu étudier l'effet de nos molécules avec une cinétique de traitement plus importante (jusqu'à 21 jours). Pour cela nous avons étudié la déméthylation du promoteur de *CDKN2A* (*P16*) dans la lignée HCT116 issue d'un cancer du colon (Herman *et al.*, 1996a ; Boström *et al.*, 2001). Selon les études une hyperméthylation de ce promoteur est effectivement présente dans 12 à 51% des cancers colorectaux (Shima *et al.*, 2011). *CDKN2A* est ainsi très souvent inclus dans le panel de marqueurs utilisés pour évaluer le phénotype CIMP (CpG Island Methylator Phenotype)(Bihl *et al.*, 2012).

3. Caractérisations de nouveaux inhibiteurs de DNMTs

Pour caractériser le mécanisme d'action de nos composés d'intérêt, nous avons étudié en particulier quelles étaient les conséquences sur la chromatine, suite à leur utilisation lors de traitements cellulaires entraînant une déméthylation.

Dans le but de corréliser cette déméthylation et un effet sur la conformation de la chromatine, nous avons utilisé une méthode appelée NOME-Seq (Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing) qui permet d'analyser à la fois l'état de méthylation des CpGs et le positionnement des nucléosomes sur un locus précis. Cette technique proche du BCS permet d'analyser l'accessibilité de l'ADN, que l'on méthyle artificiellement par l'utilisation de la méthyltransférase de GpC, M.CviPI. En effet, si cette enzyme ne méthyle pas les GpCs, cela indique que l'ADN n'est pas sensible à l'action de l'enzyme car protégé par la présence de nucléosomes et inversement (Kelly *et al.*, 2012). Pour cela nous avons utilisé la lignée KG1 CMV-Luc dans laquelle nous avons analysé l'effet de nos composés sur la séquence promotrice CMV qui contrôle l'expression du gène de la luciférase.

Nous avons également analysé, sur cette région promotrice, les modifications de marques d'histones et de plusieurs facteurs de transcription, par la technique de ChIP.

3.1. Méthylation de l'ADN et conformation de la chromatine

3.1.1. Notre modèle d'étude : CMV-Luc

Plusieurs études ont montré que les NFR (Nucleosome Free Regions) se trouvent principalement au niveau des régions promotrices (Sharma *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011). C'est pourquoi, afin de déterminer l'effet de nos molécules sur de telles régions promotrices, nous avons choisi de travailler sur la lignée KG1-Luc dans laquelle le promoteur CMV contrôle l'expression du gène rapporteur de la luciférase. Dans notre modèle le promoteur CMV est méthylé et la luciférase est très faiblement exprimée. Ce modèle permet ainsi de quantifier facilement une ré-expression génique par dosage de la luciférase et d'analyser en parallèle, la méthylation des CpGs sur ce promoteur, les effets sur l'organisation de la chromatine comme la position des nucléosomes mais encore les marques d'histones associées et le recrutement de facteurs de transcription.

La taille du promoteur CMV que nous avons analysé est de 567pb. Pour des questions techniques (efficacité de PCR, limitations lors des étapes de clonage et de séquençage) mais aussi de précision lors des analyses, nous avons scindé le promoteur en deux zones, en utilisant deux couples d'oligonucléotides [Tableau 6] qui permettent d'amplifier la totalité de la région promotrice [Figure 28]. Le couple d'oligonucléotides CMV S1 permet d'amplifier les premiers $\frac{3}{4}$ du promoteur (446pb, de la position 25 à 471, contenant 23 sites CpGs) tandis que le couple CMV S2 amplifie la dernière partie du promoteur (138pb, de la position 454 à 745, contenant 18 sites CpGs) et une partie intergénique présente entre la fin de la séquence du promoteur et le début du gène de la luciférase.

Nous avons ainsi déterminé la méthylation du promoteur CMV en utilisant la technique de BCS et obtenu un profil de méthylation CpG par CpG [Figure 27] comme cela a été décrits dans la littérature (Si *et al.*, 2010).

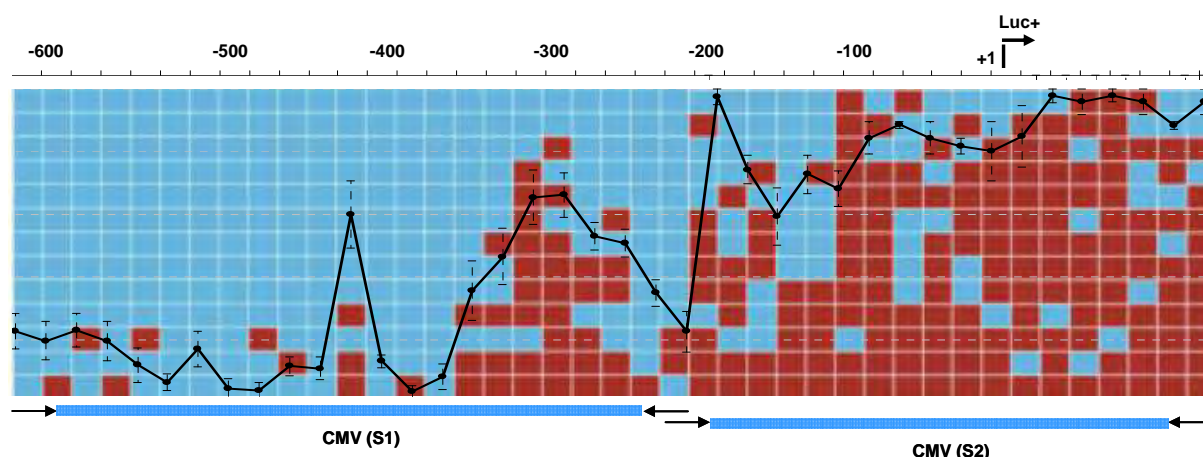


Figure 28. Méthylation du promoteur CMV.

Résultat représentatif de la méthylation du promoteur CMV obtenu par BCS : une ligne représente un clone séquencé et chaque colonne représente un site CpG. Chaque carré bleu correspond à un CpG non méthylé, et les carrés rouges aux CpG méthylés. La méthylation moyenne de l'ensemble du promoteur est de 45% ($\pm 7\%$). Ce résultat est obtenu par assemblage des deux zones amplifiées par PCR (CMV S1 et CMV S2), puis analysées pour couvrir la totalité du promoteur. La courbe en noir représente le profil de méthylation obtenu à partir de 3 expériences indépendantes (\pm l'écart-type).

Nous avons ensuite utilisé la technique de NOMESeq afin de déterminer si, sous l'action de nos composés, une réexpression du gène de la luciférase est liée à une déméthylation de l'ADN associée à une ouverture de la chromatine.

3.1.2. Mesure de l'occupation des nucléosomes et de la méthylation de l'ADN par séquençage (NOMESeq)

i. Principe du NOMESeq (Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing)

Nous avons étudié l'interaction entre la méthylation de l'ADN et la position des nucléosomes afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de nos molécules et les comparer à la 5azadC. Pour cela, j'ai mis en place la technique de NOMESeq à travers l'encadrement de Tatiana Shorstova lors de son stage de M2R.

Cette technique a été développée dans l'équipe de Peter Jones ¹ qui explique que « cette méthode utilise d'abord le séquençage bisulfite de l'ADN et permet de capturer un instantané d'un promoteur particulier, ou d'une séquence enhancer, par exemple » (Source www.biotechniques.com). Elle est basée sur l'utilisation d'une méthyltransférase de cytosines spécifique des séquences GpC (*M.CviPI*) (Xu *et al.*, 1998) et sur

l'innaccessibilité de l'ADN à cette enzyme en présence de nucléosomes. L'intérêt d'utiliser cette technique dans nos études, repose sur le fait qu'elle permet de déterminer à la fois la méthylation de l'ADN et la position des nucléosomes sur le même échantillon [Figure 29] (You *et al.*, 2011 ; Kelly *et al.*, 2012).

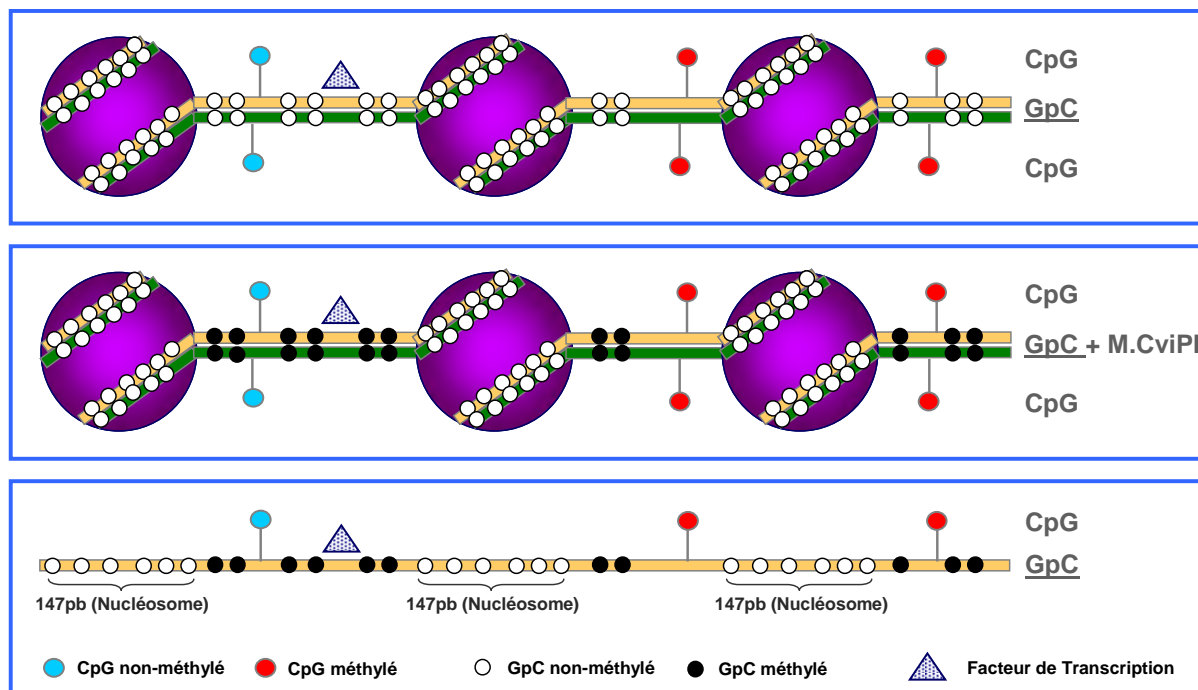


Figure 29. Principe du NOMeSeq.

Cette figure présente le principe du NOMeSeq schématisé : l'ADN est enroulé autour de trois nucléosomes représentés par les gros cercles violet, tandis que les 2 brins d'ADN sont représentés l'un en beige, l'autre en vert. Les sphères bleues représentent des CpG méthylés et les sphères rouges les CpG non-méthylés. Les sphères blanches représentent des GpC. Lorsque les échantillons sont traités avec la methyltransférase *M.CviPI*, les GpC situés entre les nucléosomes sont accessibles et méthylés par l'enzyme. Ces GpC méthylés sont représentés schématiquement par les sphères noires. Finalement, les dernières étapes de conversion de l'ADN au bisulfite de sodium, de clonage et de séquençage permettent d'obtenir la séquence de la région étudiée. Sur cette séquence, la méthylation des CpG est représentée par les sphères bleues et rouges, et la position des nucléosomes par les sphères blanches et noires.

Plusieurs étapes doivent être mises en œuvre. Tout d'abord, il est nécessaire de réaliser l'extraction de la chromatine qui est ensuite traitée avec l'enzyme *M.CviPI* suivie d'une purification de l'ADN. Une étape de conversion au bisulfite de sodium, de l'ADN ainsi préparé, permet de convertir les cytosines non-méthylés en uraciles alors que les cytosines méthylés ne sont pas modifiées. On réalise ensuite une amplification par PCR de la région que l'on souhaite étudier; les uraciles deviennent alors des thymidines

tandis que les cytosines méthylées restent des cytosines. Une dernière étape de clonage et de séquençage des produits de PCR permet l'analyse de la méthylation des sites GpCs et CpGs sur le même ADN.

L'enzyme *M.CviPI* méthyle uniquement les GpCs "accessibles" et lorsque les GpCs ne sont pas méthylés par l'enzyme cela indique que la chromatine se trouve dans une conformation fermée due à la présence d'un nucléosome. Les sites GpCs sont souvent présents dans le génome ce qui rend cette technique très informative. De plus, les GpCs ne sont pas méthylés de façon endogène et n'empêchent donc pas d'analyser la méthylation endogène des CpGs. Ainsi, l'analyse des sites CpGs montre le profil de méthylation de l'ADN tandis que l'analyse des sites GpCs donne l'information concernant la position des nucléosomes. Cette méthode permet ainsi d'étudier en parallèle, deux composantes épigénétiques sur le même échantillon.

ii. Protocole expérimental

- Dosage de la Luciférase

Après traitement des cellules avec les composés à tester, l'induction du promoteur est mesurée par quantification de la luciférase sur 100µL de la suspension cellulaire à l'aide du réactif ONE-Glo™ Luciferase (Promega) selon le protocole du fournisseur. La luminescence est mesurée sur un lecteur de microplaques EnVision™ Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer). Les données sont exprimées en facteur d'induction (FI) calculé en fonction d'un échantillon contrôle de cellules non traitées (en présence de 0,01% de DMSO).

- Extraction nucléaire et méthylation de la chromatine avec *M.CviPI*

L'extraction de la chromatine est réalisée à partir de culots de 2.10^6 cellules traitées avec les différents composés. Ces culots sont repris dans 1mL de tampon froid Nuclei buffer (Tris pH 7,4 à 10mM, NaCl à 10mM, MgCl₂ à 3mM, EDTA à 0,1mM, complété en inhibiteurs des protéases 1x) et incubés dans la glace pendant 10min. On ajoute 100µL d'une solution froide de NP-40 10% et après une homogénéisation par aspiration-refoulement la suspension cellulaire est centrifugée à 5000 rpm pendant 5min à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est lavé 2 fois dans 1mL de tampon Nuclei buffer.

Le culot obtenu est resuspendu dans 200µL du tampon *M.CviPI* 1x (New England Biolabs) complété en sucrose à 0,3M. Chaque échantillon est divisé en deux auquel on ajoute 75µL d'une solution de réaction contenant le tampon *M.CviPI* 1x (New England Biolabs), le sucrose à 0,3M, du SAM à 160µM (New England Biolabs). 100 unités de l'enzyme *M.CviPI* (New England Biolabs) sont ajoutés sur une moitié de chaque échantillon (*M.CviPI*+) tandis que 25µL d'eau sont

ajoutés sur l'autre moitié (*M.CviPI*-) de l'échantillon de départ. Tous les échantillons ainsi préparés sont incubés pendant 15min à 37°C. Pour finir, l'enzyme est inactivé par ajout de 200µL d'une solution Stop (Tris HCl pH 8 à 20nM, NaCl à 600mM, SDS à 1%, EDTA à 10mM) et incubés sur la nuit à 55°C en présence de 0,2 µg/µL de Protéinase K (Qiagen).

- Purification de l'ADN chromatinien

L'ADN est purifié par addition d'un volume (400µL) d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamyl (Sigma-Aldrich) suivi d'une centrifugation de 10min à 20000g. Cette étape permet de précipiter les protéines dénaturées. La phase aqueuse est récupérée et l'ADN est précipité par ajout 2 volumes (800µL) d'éthanol absolu, 5µL de glycogène à 5mg/mL (Ambion® by Life technologies) et 160µL d'acétate de sodium à 0,3M (Sigma). Cette suspension est centrifugée à 4°C à 20 000g pendant 30min. Le surnageant est éliminé et le culot lavé dans 2 volumes d'éthanol à 70%. Une dernière centrifugation à 4°C à 20 000g pendant 30min permet d'obtenir les culots d'ADN qui sont séchés à température ambiante avant d'être remis en solution dans 50µL d'eau RNase/DNase free (Qiagen). Les échantillons sont ensuite dosés à l'aide d'un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) et peuvent être stockés à -20°C.

- Conversion au bisulfite de sodium

L'étape de conversion au bisulfite de sodium est réalisée sur 1µg d'ADN à l'aide du kit EZ DNA methylation Gold Kit (Zymo) suivant les recommandations du fournisseur. Les échantillons sont élués dans 12µL d'eau RNase/DNase free (Qiagen).

- Amplification du promoteur CMV par PCR à partir de l'ADN bisulfité

Comme nous l'avons décrit précédemment (§ 3.1.1, page 78) le promoteur est scindé en deux zones qui sont amplifiées séparément. Le mélange réactionnel est préparé à l'aide du kit KAPA2G Robust HotStart (KAPA BIOSYSTEMS) selon le protocole du fabricant. Nous utilisons dans nos expériences 100ng de l'ADN bisulfité, 1U de la Taq polymérase KAPA2G (KAPA2G™Robust HotStart), le tampon A KAPA2G 1x, la solution Enhancer 1x, 0,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs et 0,1µM des couples d'oligonucléotides CMV S1 et CMV S2 [Tableau 6] dans un volume final de 25µL. Chaque PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur C1000 Touch™ Thermal Cyclor (BioRad) suivant une étape initiale de dénaturation de 3min à 95°C, puis 40 cycles de 20sec de dénaturation à 95°C, 30sec d'hybridation à 55°C et 30sec d'élongation à 72°C, suivie d'une dernière étape d'élongation de 1min à 72°C. Les amplicons ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse sur un gel de 2% agarose dans du tampon TBE 1x (Tris-Borate-EDTA).

- Clonage, séquençage et analyse des données

La région du promoteur CMV est amplifiée par PCR et 100 à 200 ng de chaque amplicon sont clonés comme décrit précédemment (Chapitre 4, § 2.3.1).

Une PCR d'amplification est ensuite réalisée à partir de 1µL d'une suspension bactérienne avec 1U de polymérase d'ADN TaqKAPA2G (KAPA2G™Robust HotStart) dans le tampon KAPA2G B 1x fourni, additionné d'une solution Enhancer 1x, de 2,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTP, et 320nM d'oligonucléotides M13 sens (GTAAAACGACGGCCAG) et anti-sens (CAGGAAACAGCTATGAC) dans un volume final de 20µL. Les étapes d'amplification et de séquençage sont les mêmes que décrites précédemment (Chapitre 4, § 2.3.1).

Pour réaliser les analyses des données du NOME-Seq, nous avons utilisé le logiciel Bisulfite Sequencing Methylation Analysis (BISMA) pour la méthylation des sites CpGs et le logiciel Methyl Viewer (Pardo *et al.*, 2011) (<http://dna.leeds.ac.uk/methylviewer>) pour l'analyse de la méthylation des sites GpCs. Nous avons ainsi déterminé la méthylation des sites CpG, l'accessibilité de la chromatine et la position des nucléosomes sur notre séquence d'intérêt.

3.2. Modifications des marques d'histones et recrutement des facteurs de transcription

3.2.1. Approche expérimentale sur le modèle CMV-Luc

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et le positionnement des nucléosomes contrôlent ensemble l'expression et l'extinction des gènes (Du *et al.*, 2015). C'est pourquoi, afin de caractériser le mécanisme d'action de nos inhibiteurs de DNMT nous avons analysé dans un premier temps leurs effets sur la déméthylation de l'ADN et la conformation de la chromatine, en relation avec l'expression génique. Nous avons ensuite étudié les conséquences sur les modifications des histones et sur le recrutement des facteurs de transcription. Pour faire cela, nous avons choisi d'étudier le système CMV-Luc.

Dans notre cas nous avons analysé la modification des marques d'histones H3K4me3 (marque activatrice), H3K9me3 et H3K27me3 (marques inhibitrices) mais aussi des facteurs de transcription SP1, NF-κB et CREB dont les séquences de fixation sont présentes sur la région promotrice CMV, comme représenté sur la [Figure 30].



Figure 30. Localisation des facteurs de transcription sur la séquence promotrice CMV.

Les séquences de reconnaissance des facteurs de transcription sont représentées en vert pour SP1, en rose pour NF-κB et en bleu pour CREB. Les flèches positionnées sur les séquences en italiques correspondent aux zones d'hybridation des oligonucléotides utilisés pour les qPCR réalisées sur les échantillons de chromatine immunoprécipitée.

Nous avons donc fini de caractériser nos inhibiteurs de DNMT en vérifiant que la déméthylation du promoteur CMV, associée à la ré-expression du gène de la luciférase, est bien corrélée à une modification des marques d'histones et un recrutement de certains facteurs de transcription. Pour cela nous avons utilisé notre modèle CMV-Luc pour analyser l'interaction de ces protéines sur différentes zones de la séquence promotrice de CMV [Figure 31].

Ces zones sont amplifiées à l'aide des couples d'oligonucléotides CMV (P1), CMV (P2), CMV (P3), CMV (P4), Luc+ (P5) et Luc+ (P6) [Tableau 6].

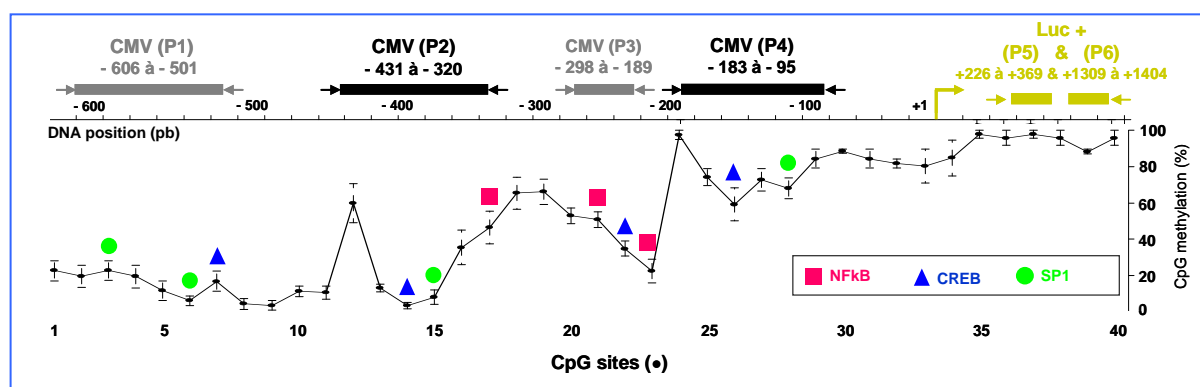


Figure 31. Profil de méthylation du promoteur CMV, positions des facteurs de transcription et des séquences analysées par ChIP-qPCR

3.2.2. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

i. Principe général de la ChIP

L'immunoprécipitation de la chromatine est une technique qui permet d'analyser des interactions qui ont lieu dans le noyau de la cellule entre l'ADN et des protéines particulières (comme les facteurs de transcription et les histones). On utilise pour cela un anticorps spécifique dirigé contre une protéine d'intérêt présumée liée à l'ADN. La première étape consiste en un pontage covalent de l'ADN et des protéines par utilisation de formaldéhyde. Les cellules sont lysées et la fraction nucléaire est fragmentée par sonication jusqu'à l'obtention de fragments d'ADN allant de 0,2 à 1 kb. Les fragments sont ensuite incubés avec les anticorps spécifiques des protéines que l'on souhaite étudier, puis les complexes anticorps-protéines-ADN sont immunoprécipités à l'aide de billes d'agarose couplées à des protéines A et G recombinantes capables de reconnaître les IgG. La quantité des fragments d'ADN immunoprécipités est ensuite analysée par qPCR en utilisant des amorces spécifiques de chaque région d'intérêt.

ii. Protocole expérimental

- Mise au point de la sonication

L'obtention des fragments d'ADN à la taille souhaitée, entre 100 et 300 pb, a nécessité une mise au point de l'étape de lyse cellulaire et de l'étape de sonication [Figure 32].

Les premiers essais ont été réalisés sur 2.10^6 cellules selon le protocole utilisant un seul tampon de lyse/sonication ne contenant pas de SDS (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.8, 5mM EDTA pH 8, 0,5% NP-40, 1% Triton X-100) et selon un cycle de sonication 15sec ON / 2 min OFF, répété 4, 6 ou 8 fois dans un volume final de tampon de 200µL (Nelson *et al.*, 2006). La sonication a été réalisée à l'aide d'un Bioruptor™-UCD-200 (Diagenode). A ce stade, une analyse sur gel d'agarose 2% a montré une absence de fragmentation de l'ADN [Figure 32-A]. Le cycle de sonication a donc été modifié comme suit : 30sec ON / 30sec OFF, répété 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 fois mais la vérification sur gel n'a pas permis de révéler de fragmentation de l'ADN dans ces conditions [Figure 32-B].

Le tampon de lyse/sonication a été remplacé par un tampon de lyse 50mM Hepes-KOH pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 10% Glycérol, 0,5% NP-40 et 0,25% Triton X100 et un tampon de sonication avec 0,1% de SDS (150mM NaCl, 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 0,95% NP-40, 0,1% Na-DOC). La sonication s'est déroulée dans 500 µL présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich) avec 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 cycles 30sec ON / 30 sec OFF. L'analyse

sur gel a révélé une bande située entre 300 et 400 pb pouvant se justifier par un manque de pureté de l'échantillon déposé sur le gel [Figure 32-C].

La même expérience a été réalisée en rajoutant un traitement avec 0,2 µg/µL de Protéinase K à pendant 1h à 55°C avant la vérification des fragments. La bande à 300-400 pb étant toujours présente [Figure 32-D], l'expérience a été réalisée sur $10 \cdot 10^6$ cellules en soniquant 1,3mL de lysat dans des tubes Falcon 15mL en polystyrène avec une sonde à sonication immergée dans le lysat et une dernière étape de purification sur gel 1% Chelex-100 (Bio-Rad) a été rajoutée. Dans ces conditions, l'analyse sur gel révèle la présence de fragments d'ADN compris entre 100 et 300 pb, lorsque la durée de sonication est supérieure à 2min [Figure 32-E et F].

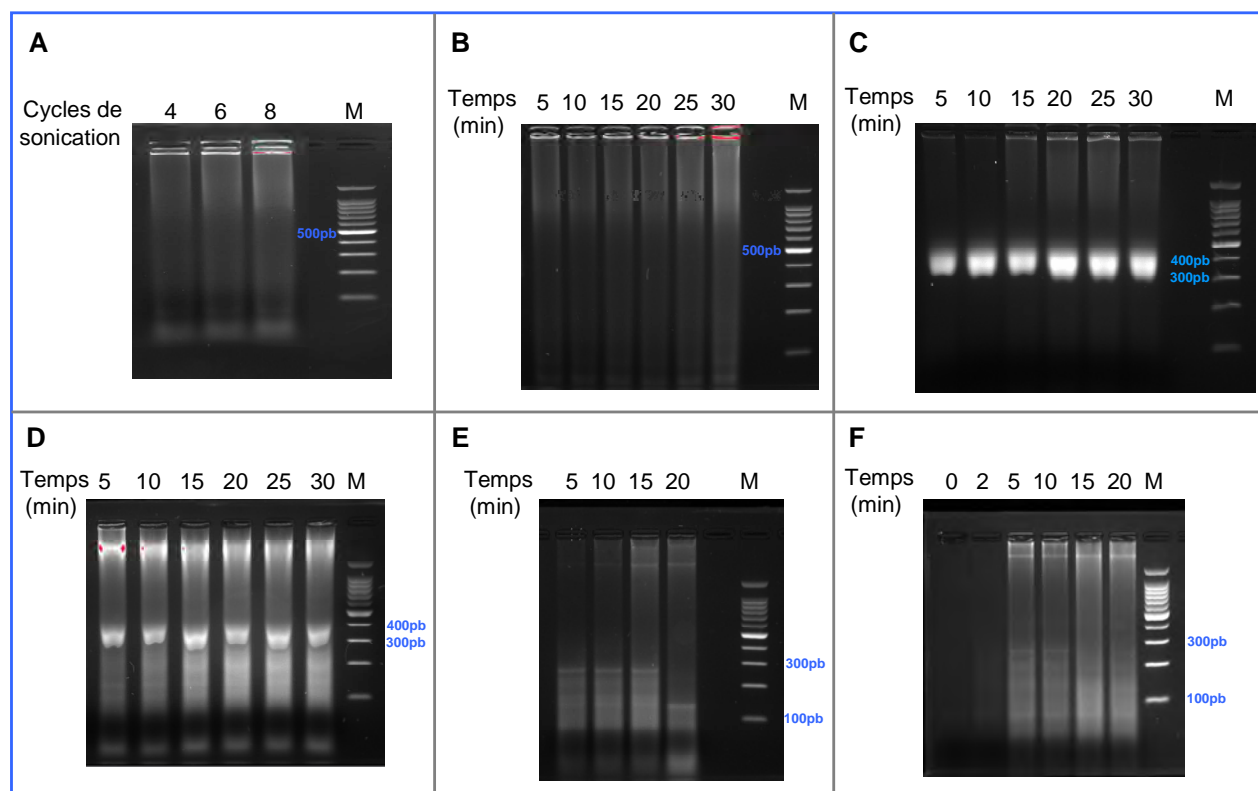


Figure 32. Sonication de la chromatine.

L'ADN est séparé par migration à travers un gel d'agarose 2% et révélé par autofluorescence sous UV, à l'aide d'un colorant de l'ADN, le GelRed™ contenu dans le gel. Plusieurs étapes ont dû être optimisées afin d'obtenir des fragments entre 100 et 300 pb : cycles de sonication (A, B), tampon de sonication (C), traitement à la Protéinase K (D), quantité de cellules, volume de sonication et purification sur Chelex-100 (E, F). Les chiffres au-dessus des gels indiquent les temps de sonication. Un marqueur permettant de déterminer la taille des fragments préparés, est déposé sur la droite de chaque gel.

- Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Pour chaque condition de traitement, $10 \cdot 10^6$ cellules sont pontées dans un volume final de 30mL avec du formaldéhyde 1% puis lysées et soniquées 10 cycles 30sec ON / 30sec OFF afin de générer des fragments d'ADN de 100 à 300 pb, suivant les conditions optimisées décrites ci-dessus. Les immunoprécipitations sont réalisées avec 50µL de billes d'agarose Protéine A/G (Thermo Fisher Scientific) ajoutés par échantillon en présence d'anticorps polyclonaux ChIP-grade spécifiques de H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, NF-κB, CREB, SP1 et RNA Pol.II. Un anticorps contrôle dirigé contre les IgG de lapin [Tableau 7] est également utilisé. La chromatine immunoprécipitée est séparée des billes dans 220µL de Tampon d'Elution (50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1% SDS) par un traitement thermique de 15min à 65°C avant d'être dénaturée par ajout de 55µL d'une solution de NaCl 1M (200µM final) pendant 16 heures à 65°C. L'ADN ainsi récupéré subit enfin un traitement de 45 min à 37°C avec 1 µg/µL de RNase A (Qiagen) puis 0,2µg/µL de Protéinase K (Qiagen) pendant 90min à 55°C avant d'être purifié par une extraction phénol-chloroforme. Les culots sont finalement remis en solution dans 50µL d'H₂O nuclease-free.

Nom	Espèce	C°(µg/µL)	Quantité/IP	Volume/IP (µL)	Fournisseur	Référence
H3K4Me3	Lapin	1	2 µg	2	Diagenode	C15410003
H3K9Me3	Lapin	2,7		0,74	Diagenode	C15410193
H3K27Me3	Lapin	1,9		1,05	Diagenode	C15410195
NF-κB p65	Lapin	-		5	Active Motif	39369
SP1	Lapin	0,512		3,9	Active Motif	39059
CREB	Lapin	1		2	Abcam	ab31387
IgG Lapin	Lapin	5		0,4	Abcam	ab37415
RNA Pol II	Souris	1		2	Millipore	05-623-Z

Tableau 7. Anticorps utilisés dans les expériences de ChIP.

- Mise au point de la qPCR

Pour analyser l'état de la chromatine au niveau du promoteur CMV après immunoprécipitation, plusieurs qPCR ont été réalisées afin de couvrir l'ensemble du promoteur et des sites de fixation NF-κB, CREB et SP1. Des couples d'amorces ont aussi été utilisés pour vérifier la fixation de la RNA Pol II sur le gène de la luciférase. Au total, deux couples ont été testés sur le gène de la luciférase, cinq couples sur la séquence du promoteur CMV. Suite à l'analyse des courbes de fusion obtenues pour chaque couple d'amorces, un couple d'oligonucléotides sur le promoteur CMV a été exclu de l'étude en raison d'un manque de spécificité [Figure 33].

Les qPCR sont réalisées dans les conditions suivantes : 0,8µM de chaque amorce sont préparés dans 6µL de SYBR Premix ExTaq (Takara) et mélangés avec 6µL d'ADN préalablement dilué au tiers. L'amplification de l'ADN est réalisée dans les conditions suivantes : 30sec à 95°C suivis de 40 cycles de 5sec à 95°C et 30sec à 60°C. La spécificité de chaque réaction de qPCR est vérifiée par analyse des courbes de fusion pour chaque couple d'oligonucléotide utilisé selon le programme suivant : 15sec à 95°C et 15sec à 65°C puis un gradient de 0,5°C toutes les 10sec jusqu'à 95°C.

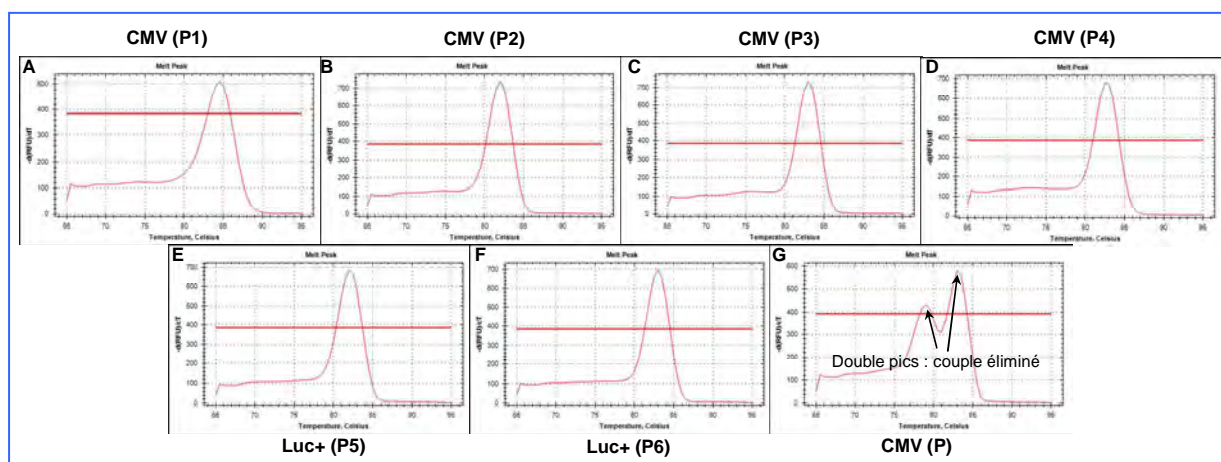


Figure 33. Spécificité des couples d'oligonucléotides utilisés dans nos expériences de ChIP.

Courbes de fusion réalisées à partir des amplicons obtenus par qPCR, avec les couples d'oligonucléotides destinés à nos expériences de ChIP. Les courbes A à D sont réalisées à partir des amplicons obtenus avec les couples permettant d'amplifier quatre régions sur la séquence du promoteur CMV. Les courbes E et F sont réalisées à partir d'amplicons obtenus avec deux couples positionnés sur deux régions de la séquence du gène de la luciférase Firefly (Luc+). Le couple correspondant à la courbe G n'a pas été utilisé dans nos expériences compte tenu de sa non-spécificité.

Les résultats de qPCR sont exprimés en Fold Enrichment (FE). La méthode de calcul utilisée est une méthode classique en qPCR, dite de $\Delta\Delta C_t$, qui permet ici de mettre en évidence un enrichissement des marques d'histones et des facteurs de transcription, immunoprécipités à partir d'un échantillon traité (TT) par rapport à un échantillon contrôle non traité (NT). La valeur de bruit de fond obtenue avec le contrôle isotypique (IgG) est soustraite pour chaque échantillon analysé.

$$\begin{aligned}\Delta C_t' &= \Delta C_{t_{Ech}} - \Delta C_{t_{IgG}} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_{t_{TT}}' - \Delta C_{t_{NT}}' \\ FE &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$



TROISIEME PARTIE

PROJET DE RECHERCHE

Chapitre 5 – Caractérisation de nouveaux inhibiteurs de DNMTs

Au cours de cette thèse, j'ai étudié plusieurs familles d'inhibiteurs de DNMT. J'ai réalisé ce travail en collaboration étroite avec les chimistes en charge de la modulation chimique des molécules. Les composés que nous étudions ont été identifiés soit lors de criblages, soit par une approche rationnelle. J'ai participé ainsi à l'optimisation de plusieurs séries. Une série issue de la modulation de l'inhibiteur connu SGI-1027 et la première série identifiée lors du criblage ont été publiées sous forme d'article ([Rilova et al., 2014](#) ; [Erdmann et al., 2015a](#), Annexes 2 et 3) et une deuxième série spécifique de l'inhibition de DNMT3A est soumise à *Future Medicinal Chemistry* ([Erdmann et al., 2015b](#), Annexe 4). Une autre série que j'ai identifiée en particulier fait l'objet de deux demandes de brevet ([Menon et al., EP15306556.0](#) ; [Menon et al., EP15306555.2](#)).

Enfin, la majeure partie de ce travail de thèse a été consacrée à étudier les propriétés pharmacologiques, dans des cellules cancéreuses, de deux familles d'inhibiteurs. La première est constituée de composés de type 3-chloro-3-nitroflavanone ([Menon et al., soumis pour publication](#)), identifiés lors du criblage d'une banque de flavonoïdes constituée par le Dr. D. Dauzonne à l'Institut Curie ([Ceccaldi et al., 2011](#)). La deuxième vient d'une approche rationnelle développée par le Dr. L. Halby au cours de sa thèse dont le sujet portait sur la conception et la synthèse de nouveaux inhibiteurs de DNMT ([Halby et al., en préparation](#)).

1. Inhibiteurs de type flavanones

1.1. Contexte de l'étude

Initialement, ces composés ont été mis en évidence par le criblage d'une chimiothèque de flavonoïdes ([Ceccaldi et al. 2011](#)). Ils ont été choisis pour leur proximité structurelle avec la génistéine, décrite comme inhibiteur cellulaire de DNMT ([Fang et al. 2005](#)). Ces composés ont également montré un effet *in vivo* en induisant des malformations sur des embryons de poissons-zèbres, ce qui est caractéristique de l'inhibition de la méthylation de l'ADN ([Martin et al. 1999](#)).

Lors de ce criblage, la 3-chloro-3-nitroflavanone **69** était le composé le plus puissant identifié contre le complexe catalytique murin Dnmt3A/3L.

Les travaux réalisés dans notre équipe par Christina Gros au cours de sa thèse ont montré que cette flavanone **69** induisait une réexpression de la Luciférase dans notre système rapporteur, après 24h d'incubation à 10µM (FI = 3,4 ± 0,3). Ses travaux ont également mis en évidence un différentiel d'activité *in vitro* entre ses énantiomères et le mélange racémique. Nous avons donc réalisé la suite des travaux avec l'énantiomère le plus actif identifié comme le composé **1 (69(2S, 3R))** (Cf article : chapitre 5 § 1.2, Figure 1 et Supplementary Figure 1).

Cependant, l'instabilité de cette molécule dans les tampons d'études biologiques et la difficulté de reproductibilité de certains résultats cellulaires ont conduit notre équipe en collaboration avec le Dr D. Dauzonne à synthétiser de nouveaux dérivés. Le composé **3**, dérivé du composé **1(69)** substitué en 3' sur le cycle B par un groupement méthoxy a ainsi été obtenu (Cf article : chapitre 5 § 1.2, Figure 3). Cette modification chimique a permis de stabiliser la molécule (76% de composé **3** restant après 2h d'incubation dans le tampon de méthylation contre 50% pour le composé **1**) et d'augmenter l'activité avec une IC₅₀ sur Dnmt3A/3L de 0,7µM ± 0,2µM contre une IC₅₀ de 2,6µM ± 0,7µM avec le composé **1**. Ce composé **3** est ainsi l'une des molécules les plus actives *in vitro* de la série des 3-chloro-3-nitroflavanones mais aussi parmi toutes les molécules étudiées au laboratoire.

Comme pour le composé **1**, une séparation sur colonne chirale des deux énantiomères du composé **3** a été entreprise mais elle s'est avérée impossible. Nous avons donc continué nos études sur le mélange racémique du composé **3**.

Nous nous sommes intéressés à l'effet de cette molécule sur la méthylation du promoteur CMV mais aussi sur la méthylation des îlots CpGs de promoteurs endogènes dans différentes lignées cancéreuses. Nous avons étudiés en particulier la déméthylation et la ré-expression des gènes suite à des traitements prolongés dans le temps (de plusieurs jours à plusieurs semaines) mais également aux modifications de la chromatine. Cette étude est décrite dans l'article ci-dessous.

1.2. Publication

Epigenetic profiling of flavonoid inhibitors of DNA methyltransferases in cancer cells

Yoann Menon, Arnaud Carrier, Veronique Masson, Christina Gros, Yannick Aussaguès, Fanny Assemat, Tatiana Shorstova, Marianne Spruijt, Elisa Redl, Gerda Egger, Natacha Novosad, Florence Busato, Jörg Tost, Dominique Guianvarc'h, Frédéric Ausseil, Nicolas Molinier, Christophe Long, Daniel Dauzonne, Paola B. Arimondo

Epigenetic profiling of flavonoid inhibitors of DNA methyltransferases in cancer cells

Yoann Menon[‡], Arnaud Carrier[‡], Veronique Masson[‡], Christina Gros[‡], Natacha Novosad[‡], Yannick Aussaguès[‡], Fanny Assemat[‡], Tatiana Shorstova[‡], Marianne Spruijt[‡], Elisa Redl[#], Gerda Egger[#], Florence Busato[¶], Jörg Tost[¶], Dominique Guianvarc'h[£], Nicolas Molinier[‡], Christophe Long[‡], Frédéric Ausseil[‡], Daniel Dauzonne^{§,&}, Paola B. Arimondo^{‡*}

[‡] CNRS-Pierre Fabre USR3388 ETaC, Epigenetic Targeting of Cancer, CRDFP 3 avenue H. Curien, 31035 Toulouse cedex 01, France

[#] Clinical Institute of Pathology, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna, Austria

[¶] Laboratory for Epigenetics and Environment, Centre National de Génotypage, CEA-Institut de Génomique, 91000 Evry, France

[£] Laboratoire des BioMolécules, UMR 7203, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6 - ENS - CNRS, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

[§] Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, F-75248 Paris cedex 05, France

[&] CNRS, UMR 3666 / INSERM U1143, 26 rue d'Ulm, F-75248 Paris cedex 05, France

* to whom correspondence should be addressed: paola.arimondo@etac.cnrs.fr

KEYWORDS. *DNA methylation, catalytic inhibitors, DNMT, flavanones, NOME-seq*

ABSTRACT: In mammals, DNA methylation is a chemical modification involved in the regulation of gene expression by controlling the access to the DNA sequence. Aberrant DNA methylation patterns are observed in various pathologies, such as cancer. There is a great interest in new potent inhibitors of DNA methyltransferases. Here, we characterized the pharmacological effects of a potent flavonoid inhibitor of DNA methyltransferases in leukemia and colorectal cancer cell lines. *CDKN2A* and *CDKN2B* promoter demethylation was monitored by bisulfite-dependent assays together with their re-expression. Treatment time-courses were explored up to 21 days, revealing a delay between the first treatment and the effect on DNA methylation. In addition, a coupling effect between DNA demethylation, chromatin accessibility and gene expression was observed upon treatment with the inhibitor, revealing a dynamic and regulated interplay between promoter demethylation by the inhibitor, nucleosome displacement, decrease in the histone modifications H3K27me3 and H3K9me3, recruitment of transcription factors, RNA polymerase II and the active histone mark H3K4me3.

INTRODUCTION

Epigenetic modifications play an essential role in the establishment and regulation of biological programs that define when and where genes are expressed. Among these modifications, C5 methylation of deoxycytidines (dC) in the DNA was shown to play a key role in epigenetic regulation in mammals¹. It is the most stable epigenetic mark and occurs mainly at CpG sites, which are regrouped in islands and essentially located in promoters, repeated sequences and CpG island shores². Hypermethylation of promoter CpG islands is associated with gene silencing, while hypomethylation might lead to increased gene expression.

DNA methyltransferases (DNMTs) catalyze the transfer of a methyl group from *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) to position 5 of the cytosine at the CpG site. Two families of catalytically active DNMTs have been identified: DNMT1, responsible for DNA methylation maintenance during replication, and DNMT3A and 3B, responsible for *de novo* DNA methylation.

Approximately 60% of human gene promoters are associated with CpG islands³. CpG islands are typically maintained free of DNA methylation and this is permissive for gene expression. However, in many human cancers, a proportion of CpG islands becomes hypermethylated and this is linked to silencing of some genes such as tumor suppressor genes⁴. For example, promoter DNA hypermethylation and associated silencing of tumor suppressor gene *CDKN2B*, encoding P15^{INK4b}, has been reported in up to 80% of AML⁵. Restoring the gene expression by specific inhibition of DNA methylation represents an attractive therapeutic strategy^{6,7}. Indeed, DNMT inhibitors can induce hypomethylation of promoter regulatory regions of tumor suppressor genes silenced by DNA methylation, thereby reactivating them and promoting cell growth arrest and differentiation. Accordingly, treatment of leukemia cell lines and patient blasts with 5-azadC induced hypomethylation and reactivation of P15^{INK4b}⁸.

DNMT inhibitors (DNMTi) can be divided into two families: nucleoside and non-nucleoside analogs. The first are the most active and characterized ones. Two of them are FDA approved for therapeutic use in myelodysplastic syndrome (MDS), acute myeloid leukemia (AML) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML)⁹: 5-azacytidine (5azaC, Vidaza®) and 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC, Dacogene®). These drugs act as suicide substrates mimicking cytosine, and, once incorporated into DNA in S phase, they are able to trap DNMTs. Trapped DNMTs are degraded by the proteasome resulting in hypomethylation of the DNA during subsequent replication cycles¹. Cytosine analogues are currently tested against many types of solid tumors⁷. Despite the high

efficiency of the azadrugs, their poor bioavailability, their instability in physiologic media and their little selectivity, due to their incorporation into DNA replacing any cytosine, restrict their use¹⁰. Several non-nucleoside analogs were developed. However most of them lack target specificity and efficacy⁶.

Here, we focused on the flavonoid series of DNMT inhibitors that we previously discovered in a screening campaign against the murine Dnmt3A/3L catalytic complex¹¹. After chemical modulation, chloro-nitroflavanone **3** was identified as a potent inhibitor of human DNMT3A, able to demethylate and to reactivate tumor suppressor genes in cancer cells. Importantly, in a reporter gene model in leukemia KG-1 cells, the DNMT inhibitor reactivated the luciferase gene under the control of a methylated CMV promoter upon demethylation of the promoter, chromatin opening with displacement of the nucleosomes, changes in the histone modifications and recruitment of transcription factors.

RESULTS

DNA demethylation activity in cancer cells

In Ceccaldi *et al.*¹¹ we identified a potent non-nucleoside inhibitor of the catalytic complex of murine Dnmt3A/3L, the 3-chloro-2',3-dinitroflavanone **69**, herein called compound **1** (Fig. 1a and supplementary Fig. 1). In the present study we investigated its ability to demethylate the promoter of tumor suppressor genes in both hematological and solid tumor cell lines and the molecular consequences of this demethylation effect.

The leukemia-derived KG1 cell line was treated with compound **1** (100 and 320 nM) for 3 days and promoter methylation of *CDKN2B* (*P15*) was analyzed by bisulfite conversion of DNA followed by cloning and sequencing of the amplified sequences (Fig. 1b). The nucleoside inhibitor 5azadC was used as positive control, while flavanone **4**, having the same chemical scaffold as compound **1** but little activity in the enzymatic tests, was used as negative control. For each compound, treatment doses were chosen so to induce at most 20% of cytotoxicity at 3 days, and this in order to distinguish between an epigenetic effect (at low concentrations) and a cytotoxic effect (at high concentrations) as discussed by Tsai *et al.*¹². Flavanone **1** induced 37% ($\pm 10\%$) demethylation at 320 nM and 25% ($\pm 5\%$) demethylation at 100 nM (Fig. 1B). Similarly, 100 nM of 5azadC resulted in 37% ($\pm 5\%$) reduction of *CDKN2B* promoter methylation, but little effect was observed at 32 nM 5azadC. Lymphoma Karpas299 cells were also treated with compound **1** for 3 days. Higher concentrations were

used because Karpas299 cells are more resistant to the compounds (Supplementary Fig. 2a); still the doses were chosen in order to induce not more than 20% of cell death. Treatment with compound **1** at 5 μ M and 1 μ M induced 30% ($\pm 9\%$ and $\pm 14\%$, respectively) decrease in DNA methylation at the *CDKN2B* promoter (Supplementary Fig. 2a). For comparison, 1 μ M 5azadC resulted in 26% ($\pm 18\%$) reduction of methylation, while no effect was observed with 320 nM 5azadC.

Then compound **1** was assayed in solid cancer cells lines. In HCT116 cells derived from a human colorectal carcinoma, it induced a demethylation of the *CDKN2A* (*P16*) promoter with a maximum decrease of about 20% ($\pm 4\%$) at 100 nM during 3 days, while 10 nM and 100 nM of 5azadC resulted in 31% ($\pm 7\%$) and 60% ($\pm 7\%$) DNA methylation reduction, respectively (Fig. 1c). In prostate carcinoma-derived LNCaP cells, the active compound **1** resulted in decreased methylation of *HOXA7* and *SERPINB1* (Supplementary Fig. 3). Interestingly, the compound seemed to be most effective in a concentration range between 100nM to 320nM and displayed less efficacy at higher doses in agreement with observations made for 5azadC (Supplementary Fig. 3 and data not shown).

Next, changes in the expression of *CDKN2B* were investigated by qPCR in KG-1, Karpas299 and HCT116 cells, since there is a negative correlation between promoter DNA methylation and the corresponding gene expression. In all cancer cell lines, compound **1** did not induce re-expression of the tumor suppressor genes after 3 days of treatment at concentrations that induced demethylation of the promoters (Fig. 1d and e, and Supplementary Fig. 2b). In the same conditions, 32 nM and 100 nM of 5azadC showed a strong increase in the expression of *CDKN2B* in KG-1 cells after 3 days of treatment (Fig. 1d), while no reactivation of the gene was observed in Karpas299 cells (Supplementary Fig. 2b) and no reactivation of *CDKN2A* was observed in HCT116 cells (Fig. 1e). These results prompted us to further chemically optimize compound **1** and to explore the treatment conditions with the compound. In particular, we focused on the well-characterized colon cancer cell line HCT116, since it would be most interesting to develop new DNMTi active in solid tumors, because 5azaC and 5azadC are FDA-approved to treat hematological cancers. In addition, we recently confirmed that HCT116 is very sensitive to the knock-down of DNMT1 by RNA interference compared to the more resistant leukemia KG-1 cell line¹³.

Chemical optimization of the flavonoid inhibitor.

With the aim to understand the weak potency of compound **1** in the cellular models, we investigated its chemical stability in the cell media. Only 45% of product was recovered after incubation for 2h at room temperature in the physiological media (Fig. 2). We believe that the chemical instability is due to the β -elimination that occurs on position 2 eliminating HCl (depicted in green) to recover the corresponding 3-nitroflavone, inactive in the enzymatic test at 50 μ M (data not shown). Since the presence of the NO₂ in ortho of cycle B (depicted in blue in Fig. 2) promotes this β -elimination, we hypothesized that the presence of an electron-donating group in *meta* of cycle B (*para* position as regards the nitro group in 2') could stabilize the compound. Therefore, a methoxy group was placed in the 5' (depicted in red) to obtain compound **3**, which resulted in increased stability in cell media and retained the activity against human DNMT3A and DNMT1 in the enzymatic assays (Fig. 2). Thus this compound was chosen for further pharmacological characterization.

Time-course studies for CDKN2A DNA demethylation and gene re-expression in colorectal cancer cells.

Tsai *et al.*¹² have reported that 5azaC and 5azadC induce epigenetic effects of cell reprogramming on the long-term when used at low non-cytotoxic doses in both hematological and solid tumor models. The authors described DNA demethylation and gene expression up to 23 days and up to 21 days after treatment, respectively. Long-term effects were also observed for inhibitors of histone methyltransferases such as the DOT1L inhibitor EPZ-5676¹⁴. Moreover, long-term effects on DNA methylation and gene expression were also observed with an siRNA directed against human DNMT1 in NCI-H1299 lung cancer and HCC1954 breast cancer cells lines¹⁵. Finally, we previously modeled the theoretical timing necessary to induce a marked demethylation effect by catalytic inhibitors that act by passive demethylation and found that, depending on the potency of the inhibitor, several cell doubling cycles are needed (see Figure 7 in ref.⁶). Therefore, we chose to follow the effect on DNA methylation and gene expression induced by compound **3** on a longer period of time, up to 21 days (Fig. 3). 5azadC was used for comparison and flavanone derivative **4**, which was inactive in the DNMT3A and DNMT1 enzymatic tests, was used as negative control.

A three weeks daily treatment schedule was chosen (Fig. 3a). DNA methylation was analyzed on days 3, 7 and 21 by COBRA. With this long-term treatment schedule, compound **3** induced a demethylation of the

CDKN2A promoter with the strongest effect between days 7 (Fig. 3b), followed by a loss of the effect after 21 days and a cytotoxicity at the higher concentration tested (1 μ M). This DNA demethylation after 7 days of treatment was further confirmed by using a technology not relying on the bisulfite conversion step of genomic DNA (MSRqA, Supplementary Fig. 4). For comparison, 100 nM of 5azadC induced a significant demethylation effect of the *CDKN2A* promoter after 3 days, this effect was maintained and amplified at days 7 and 21. We also evaluated the impact of compound **3** after 10 days of treatment on global DNA methylation levels by LC-MS/MS and observed a slight global demethylation (Supplementary Fig. 5). At 7 days, we also observed a strong increase in the expression of *CDKN2A* upon treatment with compound **3** and 5azadC (Fig. 3c). This expression was decreased at 21 days in agreement with previous findings^{12,15}.

Impact on promoter methylation and chromatin remodeling in a CMV-luc model system

The roles of DNA methylation and histone modifications in cancer initiation and progression are well established and emerging data have revealed that nucleosome remodeling works in concert with DNA methylation and histone modifications in tumor-specific gene silencing. DNA methylation-induced silencing of tumor suppressor genes in cancer involves distinct changes in nucleosome positioning at transcription start site and the reactivation of silenced genes using 5azadC is accompanied by a loss of nucleosomes at promoter regions¹⁶. In order to follow experimentally this dynamics between DNA methylation and nucleosome changes during the treatment with compound **3**, we constructed a stable transgenic leukemia KG-1 cell line containing a luciferase reporter gene controlled by a methylated CMV promoter (herein called KG1-Luc). In parallel to monitoring the luciferase expression, we used the NOMeSeq method¹⁷ to follow the impact of the DNMTi treatment on DNA methylation and chromatin remodeling at the CMV promoter.

After 24h of treatment of the KG1-Luc cell line, 5 μ M of compound **3** induced a 3-fold increase in the luciferase expression compared to the inactive derivative **4** (Fig. 4a). This increase in luciferase expression was maintained 3 days after treatment at 1 μ M (Fig. 4f). In addition, this re-expression correlated with the demethylation of the CMV promoter (Fig. 4b and g). The concentrations used in the study were chosen in order to have a limited effect on the cellular viability to sustain the epigenetic effect (Supplementary Fig. 6). In this experimental construct, 5azadC was more efficient than compound **3** to induce luciferase re-expression.

In the same samples, DNA methylation and nucleosome occupancy at the CMV promoter were studied. The demethylation of the promoter (blue squares in Fig. 4c) was accompanied by a strong opening of the chromatin (Fig. 4d), which becomes accessible to the methylation by bacterial GpC methyltransferase M.CviPI (illustrated in Fig. 4e by the black squares), and by displacement of two nucleosomes. The effect of compound **3** on promoter demethylation and chromatin accessibility increased at 3 days of treatment (Fig. 4g-j).

Study of the consequences on histone modifications and transcription factors recruitment.

The KG1-Luc experimental set-up allowed us to also follow the interplay between CMV promoter demethylation and chromatin opening induced by inhibition of DNMT. To this aim, we studied the modifications of the histone marks and recruitment of transcription factors in correlation to the luciferase expression. Figure 5a illustrates, for each compound and not treated KG1-Luc cells, the CpG methylation profile of the CMV promoter and the luciferase gene, which were further studied in ChIP experiments (Supplementary Fig. 7). The binding sites of the transcription factors CREB, SP-1 and NFkB are also depicted (in blue, Fig. 5a and Supplementary Fig. 7). The DNMTi-treated KG1-Luc cells were analyzed by ChIP to follow the changes in the presence on the CMV promoter of the histone silencing marks H3K27me3 and H3K9me3 and of the transcription factors (Fig. 5b and c). On the luciferase gene, the presence of the RNA polymerase 2 (Pol II) and the active histone mark H3K4me3 were analyzed. This dynamics was followed both after 24h (Supplementary Fig. 8) and 72h (Fig. 5b and c) of treatment. For both compound **3** and 5azadC, we observed a global decrease on the CMV promoter region of the repressive histone marks (depicted by the red bars) and an enrichment of the activating H3K4me3 together with the recruitment of Pol II to the luciferase gene (green bars). The highest signal was observed at 72h (Supplementary Fig. 8). Moreover, the most recruited transcription factor is CREB, in particular after 3 days. Most interestingly, despite the difference in mechanism of action, suicide inhibitor *vs* catalytic inhibitor, both 5azadC and compound **3** presented the same profile, the former inducing greater effects.

DNA methylome analysis

These effects on the CMV promoter prompted us to analyze the DNA methylome of HCT116 cells treated with compound **3** in comparison to HCT116 cells treated with 0.01% DMSO after days 3, 7 and 21. We identified hundred genes demethylated on at least one CpG. The complete list of genes that are demethylated by compound

3 treatment compared to DMSO-treated cells with a β -value difference higher than 0.195 is reported in Supplementary Table 1. Figure 6a depicts the result of the IPA software analysis focusing on networks with a score higher than 10. Among these networks, we found eight critical biological functions that are modified by the DNMTi treatment: development, gene expression, cell cycle and proliferation, cellular movement, cell death and survival, cancer, post-translational modifications and tissue morphology. All these functions play a major role in cancer. As shown in Figure 6b, demethylation by compound **3** occurs mainly in CpGs islands (50-60% for each time point). Along the genes, the demethylated CpGs are mainly located within the TSS1500 and 5'UTR (40-70% for each time point). Some CpGs are located on the body of the genes (15-20%) and others are distributed between the TSS200, the 1st exon and the 5'UTR regions. On the contrary, Figure 6c shows that, after treatment by 5azadC, demethylation occurs mainly in the Body of the genes and in the Open sea and in the CpG Islands. Despite the difference in number of CpGs affected by the two treatments, treatment with compound **3** presents a great specificity for the demethylation of gene promoter and CpG island regions.

DISCUSSION

Hypermethylation of DNA is known to be a key epigenetic mechanism for the silencing of many genes, including those of tumor suppressors, DNA repair enzymes and receptors in cancer¹⁸⁻²⁰. Thus epigenetic drugs form a very attractive new class of chemotherapeutic agents and DNMTs inhibitors have already proven their ability to reprogram malignant cells to a more "normal epigenetic state" and thus to reactivate genes that are essential to fight tumorigenesis^{21,22}. One can distinguish two types of DNMT inhibitors: cytosine analogs have been known for more than twenty years, are used in clinics to treat hematological cancer and are currently tested against many types of solid tumors. More recently a second class of molecules, non-nucleosidic DNMT inhibitors, have been described⁶. They show a much broader chemical diversity and do not need to be integrated into DNA to be active, but their cellular demethylation is so far less efficient and the mechanisms of action remain mainly unknown. In 2011, we identified a flavanone family of compounds as potent inhibitors of DNMT3A²³. In the present study, we further studied these flavanone compounds for their ability to inhibit DNMTs in cancer cells. Optimized compounds demethylated the promoter regions of tumor suppressor genes *CDKN2A* and *CDKN2B* in colon cancer and leukemia cells, respectively. Noteworthy, the demethylation of gene

promoters was confirmed with different techniques, based or not on bisulfite-conversion of genomic DNA, in other cell lines, lymphoma and prostate cancer cells, and in two different laboratories.

Next, we addressed the consequences of this demethylation induced by the optimized inhibitor **3** on chromatin and gene expression by using an integrated reporter system where the luciferase gene is under the control of a methylated CMV promoter. Figure 7 schematizes our findings concerning the dynamics between promoter demethylation, chromatin accessibility, histone modifications, transcription factor recruitment and gene re-expression. First DNA demethylation is observed together with nucleosome displacement. Then a decrease in silencing histone modifications H3K27me3 and H3K9me3 was monitored, followed by the recruitment of the transcription factor CREB on the promoter, RNA polymerase II and activating histone mark H3K4me3 on the luciferase gene.

Noteworthy, the catalytic inhibitor **3**, developed in this study, induced the same changes and dynamics on the chromatin as the suicide inhibitor 5azadC. Notwithstanding a main difference: the potency and kinetics. 5AzadC remains more potent than compound **3**, regarding the use of lower concentrations of inhibitor, the increase in gene expression (a 40-fold increase in luciferase expression was observed with 5azadC at 72h, Fig. 4f) and the persistence of the demethylation effect (up to 21 days in Fig. 3b). This is certainly in part due to the mechanism of DNMT inhibition by the azanucleosides that upon incorporation into DNA form an irreversible covalent bond with the enzyme and induce protein degradation of the DNMTs^{24,25}. This results in a potent demethylation of the DNA because the enzymes that catalyze the methylation reaction are degraded⁶. In the case of catalytic inhibitors, which do not form irreversible covalent bonds, this cannot occur, thus requiring several doubling cycles to result in a biological effect (as observed for the increase in activity at 72h on the CMV promoter (Fig. 4 and 5) or at 7-10 days on the *CDKN2A* promoter in HCT116 cells (Fig. 3)). In addition, the catalytic inhibitor **3** induces a lower reactivation fold of the genes compared to 5azadC even at an equivalent efficacy in DNA demethylation and chromatin opening (comparison in Fig. 4f, g and i). This could be due to the fact that, by its incorporation into DNA, 5azadC induces other effects than just DNA demethylation, such as DNA damage and oxidative stress²⁶⁻²⁸. Consequently, other events, beyond the epigenetic effect, can be involved that induce this strong gene activation. In the case of the catalytic inhibitor **3** this does not occur. However, this is not the only explanation, because also in the case of 5azadC DNA demethylation is not always associated with gene re-expression (as for example here for *CDKN2A* expression at 3 days in HCT116 cells treated with

5azadC)²⁹. There is a finely tuned interplay between DNA demethylation, nucleosome positioning, histone marks and transcription factor recruitment in order to enable gene expression. Here, the KG1-Luc cells allowed to follow this dynamics at the CMV promoter and to observe how both 5azadC and compound **3** are able with time to open the chromatin, recruit transcription factors, deposit active histone marks and RNA polymerase II. Nevertheless, each gene has a different dynamics, and potent catalytic inhibitors of DNMTs, such as compound **3**, devoid of the other effects induced by the azanucleosides, can result in useful chemical tools to study this interplay important for cancer formation and maintenance.

Finally, we addressed by DNA methylome analysis whether compound **3** is able to affect genes involved in tumor maintenance. Treatment of IICT116 cells by compound **3** induced the demethylation of the promoter (TSS1500-TSS200-5'UTR- 1st exon) of hundred of genes (Figure 6). Interestingly for each set of demethylated genes after treatment, we observed that targeted networks are implicated in critical biological functions such as cell cycle, development or survival. Some of these targets remain demethylated up to day 21: the network associated with cell cycle and proliferation started at day 3 and was still demethylated at day 10, while the one associated with cell death and survival started at day 7 and lasted until day 21. Some of the genes demethylated upon treatment with compound **3** are tumors suppressor genes like *APC2*, *LET-7*, *BST1* (alias *CD38*) or *CCNY* (alias *CDK16*) (Supplementary Table 2). Others genes participate in chromatin remodeling or genome stability such as *FOXO1*, *PRDMs* and *TELO2*. Furthermore, some genes are implicated in differentiation like the *SOX* family genes. Potentially some of these genes can be re-expressed by the treatment and participate in cancer cells death or differentiation. Interestingly, after compound **3** treatment, demethylated CpGs associated to UCSC ref genes are mainly located in CpGs island and occurs on the TSS1500 and 5'UTR regions of the genes. In contrast to the results obtained after 5azadC treatment, where demethylation occurred mainly in the body of genes and in Open sea regions³⁰. There was no change in LINE-1 methylation indicating that, on the contrary to 5azadC treatment, repeated regions seem not to be impacted by compound **3** –induced DNA demethylation (data not shown). Importantly, there is a great difference on the number of CpGs that are demethylated by the two compounds, but the difference of mechanism of action for these drugs results in promoter specificity for compound **3**. Therefore, this new potent inhibitor of DNMT, non-nucleoside, is able to open the chromatin and induce gene expression of silenced genes and is, in addition, specific of gene promoters.

These results are encouraging for target specificity compared to 5azadC, and, therefore, for the long-term effects of this class of DNMT inhibitors.

Further chemical optimization of the compound is currently under way to increase its chemical stability properties in cell media and thus its cellular potency, which still needs to be improved for the development of an eventual drug candidate. Importantly, the potent DNMT inhibitor **3** described here is devoid of the other effects induced by the azanucleosides and constitutes thus a useful chemical tool to study the role and mechanisms of the aberrant DNA methylation in cancer formation and maintenance.

METHODS

Methods and associated references are available in the Online Method.

REFERENCES

1. Kelly, T.K., De Carvalho, D.D. & Jones, P.A. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* **28**, 1069-1078 (2010).
2. Gros, C. et al. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie* **94**, 2280-96 (2012).
3. Takai, D. & Jones, P.A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3740-5 (2002).
4. Baylin, S.B. & Jones, P.A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* **11**, 726-34 (2011).
5. Herman, J.G. et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* **57**, 837-41 (1997).
6. Erdmann, A. et al. Design and synthesis of new non nucleoside inhibitors of DNMT3A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**, 5946-53 (2015).
7. Ahuja, N., Easwaran, H. & Baylin, S.B. Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. *J Clin Invest* **124**, 56-63 (2014).
8. Paul, T.A., Bies, J., Small, D. & Wolff, L. Signatures of polycomb repression and reduced H3K4 trimethylation are associated with p15INK4b DNA methylation in AML. *Blood* **115**, 3098-3108 (2010).
9. Kihlslinger, J.E. & Godley, L.A. The use of hypomethylating agents in the treatment of hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* **48**, 1676-95 (2007).
10. Fahy, J., Jeltsch, A. & Arimondo, P.B. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. *Expert Opin Ther Pat* **22**, 1427-42 (2012).
11. Ceccaldi, A. et al. C5-DNA methyltransferase inhibitors: from screening to effects on zebrafish embryo development. *Chembiochem* **12**, 1337-45 (2011).
12. Tsai, H.C. et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* **21**, 430-46 (2012).
13. Vispe, S. et al. Consequences of combining siRNA-mediated DNA methyltransferase 1 depletion with 5-aza-2'-deoxycytidine in human leukemic KG1 cells. *Oncotarget* (2015).

14. Daigle, S.R. et al. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* **122**, 1017-1025 (2013).
15. Suzuki, M. et al. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res* **64**, 3137-43 (2004).
16. Lin, J.C. et al. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell* **12**, 432-444 (2007).
17. Miranda, T.B., Kelly, T.K., Bouazoune, K. & Jones, P.A. Methylation-sensitive single-molecule analysis of chromatin structure. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 21**, Unit 21 17 1-16 (2010).
18. Jones, P.A. & Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415-28 (2002).
19. Jones, P.A. & Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-70 (2001).
20. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427-40 (2002).
21. Yoo, C.B. & Jones, P.A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 37-50 (2006).
22. Azad, N., Zahnow, C.A., Rudin, C.M. & Baylin, S.B. The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past. *Nat Rev Clin Oncol* **10**, 256-66 (2013).
23. Ceccaldi, A. et al. C5-DNA methyltransferase inhibitors: from screening to effects on zebrafish embryo development. *Chembiochem*. **12**, 1337-1345 (2011).
24. Santi, D.V., Norment, A. & Garrett, C.E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 6993-6997 (1984).
25. Yoo, C.B. et al. Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* **67**, 6400-8 (2007).
26. Maes, K. et al. The role of DNA damage and repair in decitabine-mediated apoptosis in multiple myeloma. *Oncotarget* **5**, 3115-29 (2014).
27. Jiemjit, A. et al. p21(WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage. *Oncogene* **27**, 3615-23 (2008).
28. Fandy, T.E. et al. Decitabine induces delayed reactive oxygen species (ROS) accumulation in leukemia cells and induces the expression of ROS generating enzymes. *Clin Cancer Res* **20**, 1249-58 (2014).
29. Karpf, A.R. et al. Limited gene activation in tumor and normal epithelial cells treated with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol* **65**, 18-27 (2004).
30. Yang, X. et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* **26**, 577-90 (2014).
31. Bibikova, M. et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* **98**, 288-95 (2011).

Acknowledgments

We thank Martine Maitre for her technical assistance on the 16-capillary 3130 Genetic Analyzer and Drs Chantal Etievant and Joelle Riond for helpful discussions. This work was supported to P.B.A. by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Région Midi Pyrenées [Equipe d'Excellence and FEDER CNRS/Région Midi Pyrenées]; and Fondation InNaBioSanté.

Author contributions

PBA and YM designed the study, conceived the experiments, interpreted the results and wrote the manuscript. YM and TS optimized and performed the NOM-Seq experiments. VM and CG performed the enzymatic assays. NM, CL and DD synthesized, purified and characterized the chemical compounds. YA and YM run the CMV-luc experiments. YM, MS and FA optimized and performed the ChIP experiments. YM, NN, TS, ER, GE and DG measured the demethylation effect of the compounds in cancer cells. AC, FB and JT performed and analyzed the DNA methylome.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Supplementary data and tables are available online.

Figure Legends

Figure 1. DNA methylation and mRNA expression analysis after 3 days of treatment with compound **1** (dotted bars) and 5azadC (hatched bars) at the indicated concentrations compared to non treated cells (black bars) and 320 nM of inactive analog **4** (grey bars). (a) Chemical structure of compound **1**. (b) *CDKN2B* methylation status was monitored in KG1 cells by bisulfite conversion followed by cloning and sequencing. (c) *CDKN2A* methylation was analyzed by COBRA for HCT116 cells. The methylation level is represented as ratio of treated cells over non-treated and the mean value of at least two independent experiments is shown with the standard error.

mRNA expression levels of (d) *CDKN2A* were analyzed in KG-1 and of (e) *CDKN2B* expression in HCT116 cells by RT qPCR. Data represent the mean values of the ratio of treated over non treated cells of at least two independent experiments.

Figure 2. Chemical optimization of compound **1** to obtain compound **3** and comparison of the DNMT inhibition activity and stability in physiological media. Means of two independent experiments are displayed \pm standard

error. The concentration of compound at which 50% of the inhibition efficacy is obtained (EC50) was assessed from dose-response curves for each compound.

Figure 3. Time-course of *CDKN2A* methylation and mRNA expression in HCT116 colon cancer cells treated with compound **3** (white bars), inactive analog **4** (grey bars) and 5azadC (hatched bars) at the indicated concentrations. (a) Graphical schedule of the drug treatments and days of analysis. (b) *CDKN2A* methylation status was measured by COBRA and reported as mean values of the ratio of treated to non treated (NT) cells. (c) mRNA expression levels of *CDKN2A* measured by RT qPCR are reported as ratio treated to non treated (NT) cells. Each point represents the average value from at least two independent experiments. All errors bars represent standard errors.

Figure 4. Reactivation of the luciferase gene reporter is linked to DNA demethylation and chromatin accessibility at the CMV promoter in the KG-1-luc cellular construct. (a) Luminescence was measured after 24h treatment with 1 μ M of 5azadC (hatched bars) and 5 μ M of compounds **3** (white bars) and **4** (grey bars). Luciferase induction was represented as ratio to non treated cells (black bars). (b-c) CMV methylation status and (d-e) CMV chromatin accessibility were monitored by NOMeSeq on 446 bp of the CMV promoter. Methylation status (b) and chromatin accessibility (d) were represented as ratio to non treated cells (black bars) for 1 μ M of 5azadC (hatched bars) and 5 μ M of compounds **3** (white bars) and **4** (grey bars). Ratios were calculated as described in material and methods. Each point represents the mean value from two independent experiments. All error bars represent standard errors. (c) Genomic cytosine methylation is reported per clone (horizontal lines at each CpG sites analyzed (vertical lines): methylated cytosines are represented in red and non-methylated cytosines in blue. White sites represent undetermined CpGs. (e) Guanine methylation by the bacterial methyltransferase M.CviPI at the GpC sites (vertical line) is reported for each clone (horizontal line) representing chromatin accessibility. In white non-methylated guanines (=not accessible sites), in black methylated guanines (=accessible sites). In yellow and orange sites for which no data was available. After 72h treatment with 100 nM of 5azadC (hatched bars) and 1 μ M of compounds **3** (white bars) and **4** (grey bars), (f) luminescence was measured. (g-h) CMV methylation status and (i-Jj) CMV chromatin accessibility were monitored by NOMeSeq on 446 bp of the CMV promoter as described above.

Figure 5. ChIP experiments to monitor histone modifications and transcription factor recruitment at the CMV promoter and luciferase gene. (a) DNA methylation profile measured at the CMV promoter for each CpG by

bisulfite-conversion, cloning and sequencing. The theoretical binding sites of the transcription factors NFkB, CREB and SP1 are indicated in blue as well as the PCR amplicons analyzed in the ChIP experiments. Comparison of ChIP analysis in KG1-luc cells treated after 3 days with compound **3** (b) or with 5azadC (c). H3K9me3 (light red bars), H3K27me3 (dark red bars), CREB (hatched blue bars), SP1 (circled blue bars) and NFkB (squared blue bars) were followed at the CMV promoter and H3K4me3 (green bars) and Pol II (light green bars) were followed on the luciferase gene.

Figure 6. DNA demethylation profiling by Illumina 450k methylation array after compound **3** treatment in HCT116 cells for 3, 7 and 21 days. (a) Scores and networks are analyzed by the IPA software for the demethylated genes upon compound **3** treatment relative to 0.01% DMSO. Scores are indicated by the graph bars (left Y axis legend) and the ratios (focus molecules in our dataset by the network score) are indicated by the line graph (right Y axis legend). The score is a numerical value used to rank networks according to their degree of relevance to the network eligible molecules in our dataset. Fisher exact test p-value is < 0.05 . Functions associated with corresponding networks are indicated in the x-axis for each time (D stands for day) and the number of total demethylated genes per set is shown (N=).

Distribution of the demethylated CpGs is shown along the genome after treatment with (b) compound **3** at day 3 (dark blue bars), day 7 (light blue bars) and day 21 (white bars) or (c) 5azadC (from GEO: GSE51815, reference³⁰) at day 5 (dark blue bars), day 14 (light blue bars) and day 21 (white bars). The top graphs show the positions of the repartition of the demethylated CpG along the UCSC RefSeq genes according to the Illumina bead chip³¹ and the bottom graphs show the distribution of the demethylated CpGs in the genome regions relative to the CpG islands³¹. The percentage of demethylated CpGs compared to non treated cells are indicated for each region in each graph.

Figure 7. Schematic representation of the effects induced by the demethylation of the CMV promoter by the DNMTi.

ONLINE METHOD

Enzyme production

Full length histidine-tagged human DNMT1 (182kDa) was produced and purified according to Lee *et al.*³².

Catalytic human DNMT3Acat (DNMT3Acat: residues 623-908 a.a.) was produced and purified according to Gros *et al.*³³.

DNMT inhibition assays

DNMT1 inhibition assay was developed and described in Gros *et al.*³⁴. DNMT3Acat inhibition was described in Rilova *et al.*³⁵.

Cell lines, reagents and chemical synthesis.

Karpas299 human Non-Hodgkin's Ki-positive Large Cell Lymphoma and KG-1 human acute myeloid leukemia cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultivated in RPMI-1640 medium (BE12-115F, Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza, Basel, Switzerland), at 37°C and under 5% CO₂. HCT116 human colon carcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultivated in MEM glutamax medium containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and L-glutamine (BE12-115F; Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza, France), at 37°C and under 5% CO₂. LNCaP human prostate carcinoma cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

5-Aza-2'-deoxycytidine (5azadC) was obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and prepared as 10⁻²M aliquots in water. All aliquots were stored at -20°C.

Reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich or Alfa-Aesar. All chemical reactions were performed in anhydrous solvent under nitrogen atmosphere. Column chromatography was carried out on a puriflash 430 apparatus (Interchim) equipped with 30 µm porated silica column. High-resolution mass spectra were performed on a microTOF (Bruker). The NMR spectra were recorded on an Avance II spectrometer (Bruker) equipped with a ¹³C cryoprobe at 500 MHz for ¹H nucleus and 126 MHz for ¹³C nucleus. Chemical shifts (δ:) are quoted in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane, using deuterated solvent as internal standard (CDCl₃ at 7.26

ppm and DMSO- d_6 at 2.50 ppm for ^1H NMR, and CDCl_3 at 77.16 ppm and DMSO- d_6 at 39.50 ppm for ^{13}C NMR). TLC was carried out on pre-coated silica gel 60F₂₅₄ (Merck). Analytical HPLC was performed on a VWR-Hitachi apparatus ELITE LACHROM equipped with an L-2200 automated sample injector, a L-2130 pump, a L-2450 diode array detector and EZChrom software. Preparative HPLC was performed on an apparatus equipped with Laprep pump P110 (VWR), Laprep P314 Dual λ absorbance detector (VWR), Laprep P202 injector (VWR) and EZChrom software. Melting points have been measured on a Buchi Melting Point M-560 apparatus and are not corrected.

Flavanones **1**, **2** and **4** (named compound #69, 81 and 87 in ¹¹, respectively) were synthesized as previously described and prepared as 10^{-2}M aliquots in 100% DMSO. All aliquots were stored at -20°C and used as dilutions freshly prepared in culture medium.

Compound **3** (3-chloro-2,3-dihydro-3-nitro-2-(2-nitro-5-methoxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one) was synthesized starting from 2-hydroxybenzaldehyde and (*Z*)-2-(2-chloro-2-nitrovinyl)-4-methoxy-1-nitrobenzene as described in³⁶. Yield 73%; melting point $191\text{--}192^\circ\text{C}$ recrystallized in a mixture benzene/heptane.

NMR ^1H (CDCl_3 , 500MHz) δ (ppm): 3.95 (1, 3H), 7.06 (dd, $J_1 = 2.7\text{ Hz}$, $J_2 = 9.1\text{ Hz}$, 1H), 7.18 (dd, $J_1 = 2.8\text{ Hz}$, $J_2 = 8.4\text{ Hz}$, 1H), 7.29 (br. t, $J = 7.3\text{ Hz}$, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 2.7\text{ Hz}$ 1H), 7.71 (ddd, $J_1 = 1.6\text{ Hz}$, $J_2 = 7.3\text{ Hz}$, $J_3 = 8.4\text{ Hz}$, 1H), 8.02 (br. d, $J = 9.1\text{ Hz}$, 1H), 8.07 (dd, $J_1 = 1.6\text{ Hz}$, $J_2 = 7.9\text{ Hz}$, 1H).

NMR ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126MHz) δ (ppm): 56.2, 75.9, 100.9, 115.2, 116.5, 116.8, 118.4, 124.1, 126.8, 128.1, 129.5, 138.2, 141.8, 160.0, 162.6, 177.8.

HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 401.0147; found: 401.0148.

Chemical stability

Compounds were dissolved in 0.2M HEPES pH7.4, 0.5M KCl and 0.1M EDTA at a concentration of 0.001M and samples were analyzed at the indicated time ($t=0$, 1h, 2h and 4h). Samples were injected (10 μL) in HPLC analytical X-Bridge RP-18, eluted with a linear gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (95:5 to 0.100) and followed by UV-vis. Three independent experiments were carried out. The analytical HPLC equipment is a Merck-Hitachi fitted with an L-7200 automated sample injector, a L-7100 pump, a L-7450 diode array detector, D-7000 interface and EZChrom software.

Antiproliferative activity

Cells were seeded (2.10^4 for KG-1 and Karpas299 and $1.5.10^3$ for HCT116) at day 0 in a 96-well plate. Cells were treated with test compound solutions at a dose range spanning from $3.2.10^{-9}$ M to 1.10^{-5} M. Treatment was repeated on days 2 and 3, and on day 4, cell viability was assessed using the ATPLite kit (ATPlite1step Luminescence Assay System; PerkinElmer), following the manufacturer's instructions. Raw data were analyzed with Prism 4.03 to generate EC50 values corresponding to the compound concentration required to cause a 50% decrease in cell viability as compared with untreated controls.

For the other assays, cells were seeded at 2.10^5 /mL for KG-1 and Karpas299 and 1.10^5 /mL for HCT116 at day 0 in 10 mL in T25 flask and cells were treated with different compounds of interest as described.

DNA demethylation activity

Cell treatments

KG-1, Karpas299 and HCT116 were treated daily as detailed in the figures. 5-AzaC was used as positive control. At the end of the treatment, cells were harvested, washed with cold PBS and cell pellets were used for analysis. All treatment experiments were performed in triplicates.

LNCaP cells were treated on day one, two and three with either 10nM, 100nM, 320nM, 1 μ M or 5 μ M of the active compound **1** or its negative counterpart **2**. For the negative control cells were treated on day one, two and three with DMSO. As positive control cells were also treated on day one with 1 μ M 5-azadC. On day two the medium was changed and cells were cultured for two more days. On day four all cells were harvested, washed with cold PBS and cell pellets were used for DNA isolation.

All treatment experiments were performed in triplicates.

Isolation of genomic DNA

For isolation of genomic DNA cell pellets were dissolved in genomic DNA isolation buffer (0.4 M NaCl, 0.2% SDS, 0.1 M Tris pH 8.3, 5 mM EDTA). After RNase A (20 μ g/mL, Invitrogen) digestion for 30 minutes at 37°C and Proteinase K (500 μ g/mL, Invitrogen) digestion at 55°C overnight, phenol/chloroform extraction was

performed and the DNA was precipitated with 1x volume of isopropanol. The DNA pellet was washed with 75% ethanol, dried at room temperature, dissolved in sterile water and incubated at 37°C until completely dissolved. DNA concentration was measured on a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Methylation analysis

Three distinct methods were used to analyze bisulfite-converted DNA and one directly on genomic DNA.

Sodium bisulfite treatment of DNA

DNA bisulfite conversion was performed on 2 µg of DNA using the EZ DNA Methylation-Gold Kit according to the manufacturer's specifications (Zymo Research) and bisulfite-treated DNA was eluted with 10 µL of DNase free water (Qiagen). M.SssI treated control DNA (Zymo Research) and unmethylated control DNA (Zymo Research) were used as control.

Cloning and Sequencing

CDKN2B promoter PCR amplification of bisulfite-treated DNA

Bisulfite-specific primers with a minimum length of 18 bp were designed using the Primer 3 program^{37,38}. The target sequence of the designed primers contained no CpGs allowing amplification of both unmethylated and methylated DNA molecules. Several primers were tested in order to ensure high-quality amplification and specificity for bisulfite-converted DNA. The optimized primers used in this study for bisulfited *CDKN2B* amplification were: forward, 5'-TGAGATGGTAGAATAAAAATTATTA AAAA-3'; reverse, 5'-AAACAAAACATACCCAATAAAAAC-3'. The targeted DNA amplification was carried out with 2.5µL eluted bisulfite treated DNA in 50 µL PCR reaction containing 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 nM each primer and 1.0 units Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) on C1000 Touch™ thermal cycler for 94°C 2min following by 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 1 min × 35 cycles and final extension at 72°C 6 min. PCR fragments were quality controlled by agarose gel electrophoresis.

Cloning and sequencing

PCR amplicons were cloned with the StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit (Agilent Technologies), according to the manufacturers' instructions and up to 24 clones were picked for sequencing. First, a PCR with M13 primers was performed to amplify cloned sequence: each colony was suspended in 50 µL water and 1 µL of

each bacterial suspension was used to a 20 µL PCR reaction containing 1× PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 3.2 µM each primer that anneals to sites flanking the insertion/ligation plasmid site, and 1.25 units AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) on C1000 Touch™ thermal cycler with the following program: 95°C 10 min following by 95°C for 45 sec, 55°C for 45 sec, 72°C for 1 min × 35 cycles and final extension at 72°C 10 min. PCR amplicons were cleaned up using Bio-Gel-P100 (BioRad Laboratories) to remove the excess of nucleotides and primers. Final sequencing was performed using the M13 primer on a ABI 3100 capillary sequencer, using 1/8 dilution of ABI Prism BigDye terminator V3.1 sequencing chemistry after hotstart at 96°C for 60 sec and thermocycling at 96°C for 10 sec, 50°C for 10 sec, 60°C for 4 min for 25 cycles. Sequencing reactions were cleaned up using Sephadex® G-50 columns (GE Healthcare) to remove the excess of nucleotides and dyes. Electrophorogram files and methylation signals at a given CpG site were quantified using the BISMA (Bisulfite Sequencing DNA Methylation Analysis) software ³⁹.

Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

CDKN2A promoter PCR amplification of bisulfite-treated DNA

DNA amplification was carried out on 100 ng eluted bisulfite-converted DNA in 50 µL PCR reaction containing 1× PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTPs, 400 nM of each primer and 1.25 units EpiTaq HS (Takara) on C1000 Touch™ thermal cycler at 98°C for 10 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec for 40 cycles. The primers used for bisulfited *CDKN2A* amplification are: forward, 5'-GGTTTTTTTAGAGGATTTGAGGGATAGG-3'; reverse, 5'-CTACCTAATTCCAATTCCCCTACAAACTTC-3'.

20 µL of the PCR amplicons were digested in 30µL by 2 units of BsiEI (New England Biolabs) at 60°C for 90 min. DNA fragments were migrated on a 2% agarose gel and each band was quantified by Image Lab Software v2.0 (BioRad Laboratories). The percentage of demethylation is calculated for the treated cells normalized to non-treated cells:

$$\text{demethylation}(\%) = 100 \times [NT - T / NT]$$

where NT= non-treated cells and T= treated cells.

Mean values of at least two independent biological experiments are reported.

Methylation-specific PCR

0.5 µg of each DNA sample were bisulfite converted with the EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's protocol. Over night conversion was carried out in a thermocycler at 50°C for 16 hours. Then, bisulfite DNA was eluted in 30 µL of sterile water and diluted to 100 µL and three serial dilutions (1:25) of SssI-treated bisulfite-converted DNA were prepared to obtain four methylated DNA standards.

Methylation-specific primers were designed with MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>).

PCRs were performed according to the MethyLight protocol⁴⁰ but by using SYBR green instead of Taqman probes for quantification. Each PCR reaction consisted of 7.5 µL KAPA Sybr Fast mastermix (Kapa Biosystems), 2.5 µL primers (*ALU* or gene-specific, 100 mM stock primers were diluted 1:150), 2 µL of bisulfite converted DNA and 3.25 µL of sterile water. The primers used for amplification of *HIOXA7* and *SERPINB1* were respectively: forward, 5'-TTAAAGAATTCGTTTCGCGTTC-3'; reverse, 5'-CCCAATACGAAAATTAACCG-3' and forward, 5'-TTTAAAGAGGTGTTATAATATGTCGT-3'; reverse, 5'-

ATAAACGTAACCTCCGAACAACG-3'. The primers used for amplification of *ALU* were: forward, 5'-GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA-3'; reverse, 5'-

ATTAAGTAACTAATCTTAACTCCTAACCTCA-3'. Standard curves were run with *ALU* primers and sample DNA was run with both *ALU* and gene-specific primers on a BioRad cycler in duplicates. The percentage of methylated reference (PMR) compares the level of methylation in the sample to the control DNA methylated *in vitro* by M.SssI. The PMR values were calculated according to the following formula:

$$\text{PMR} = 100 \times [(\text{SQSampleGene} / \text{SQSampleAlu}) / (\text{SQSssIGene} / \text{SQSssIAlu})]$$

All PCRs were performed in duplicates.

Methyl Specific Restriction and quantitative PCR Analysis (MSRqA)

To measure the DNA methylation level directly on genomic DNA avoiding the bisulfite conversion step⁴¹, we used the 1-step method described by von Kanel *et al.*⁴². In this method, genomic DNA is incubated with a methylation-sensitive or a methylation-dependent enzyme to digest the genomic DNA templates, followed by RT qPCR amplification.

The EpiTect[®] Methyl II PCR Assay (Qiagen) was used according to the manufacturers' instructions for the *CDKN2A* promoter methylation analysis. The primers used for amplification of *CDKN2A* were: forward, 5'-CCAGAGGGTGGGGCGGACCGCGTGCG-3'; reverse, 5'-CCGACCGTAACTATTCGGTGCGTTGG-3'.

RNA isolation and quantitative real-time PCR analyses

Total RNA was extracted from the cultured cells by using the RNeasy Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol, digested by DNase I, and reverse transcribed (PrimeScript RT Master Mix, Takara). *CDKN2A*, *CDKN2B* and *P73* cDNA were amplified using the CFX384 Real-time PCR detection system (BioRad Laboratories) and SYBR Premix Ex Taq (Takara) under the following conditions: 95°C for 30 sec, followed by 40 cycles at 95°C for 5 sec then 60°C for 30 sec. A melt curve analysis was performed (60°C to 95°C, rising by 0.5°C every 10 sec). Primers used for amplification were as follows: *CDKN2A*; forward, 5'-CATGGAGCCTTCGGCTGACT-3'; reverse, 5'-CCATCATCATGACCTGGATCG-3'; *CDKN2B*; forward, 5'-GCGAGGAGAACAAGGGCAT-3'; reverse, 5'-CCGGCTTCCAGGAGCTGT-3'; *TBP*; forward, 5'-TTGACCTAAAGACCA TTGCACTTCGT-3'; reverse, 5'-TTACCGCAGCAAACCGCT TG-3'; *YWHAZ*; forward, 5'-CCCTCAAACCTTGCTTCTAGG AGA-3'; reverse, 5'-TCATATCGCTCAGCCTGCTCG-3'. All PCRs were performed in duplicates. Analyses of *TBP* and *YWHAZ* were conducted in parallel for normalization.

CMV-luc expression

Cell Line KG-1-Luc was established by using the Nucleofector[™] technology (Amaxa). We used 100 µL of Nucleofector[™] Solution R and optimal Nucleofector[™] program to transfect 2×10^6 KG-1 cells with 2 µg of plasmid pELuc+ according to the manufacture's instructions. Plasmid integrated cells were selected and maintained in culture media supplemented with 0.5 mg/mL of geneticin (Invitrogen) during two month. Plasmid pELuc+ was constructed by cloning the firefly luciferase (luc+ from pGL3; Promega) reporter gene under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc.). KG-1-Luc cells express basal level of the reporter gene under the control of CMV promoter partially methylated (~50 %). In our

experiment, KG-1-Luc were seeded at 20,000 cells per well in a 96-well plate. After 24h or 72h incubation (as specified in the text) in the presence of the test compound or solvent (DMSO), the induction of the promoter was measured by quantification of the luciferase signal with the Brite-lite assay system (PerkinElmer) according to the manufacturer's protocol. The luminescence was measured on an EnVision multilabel plate reader (PerkinElmer), and the data are expressed as the fold induction as compared with the DMSO control. The mean of three experiments and the standard error is reported.

CMV nucleosome footprinting and DNA methylation

Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing (NOMe-Seq)

NOMe-seq is a modified version of the methylation-dependent single promoter assay described by Miranda *et al.* 2010¹⁷ and the methylase-based DNA assay was performed as previously described⁴³⁻⁴⁶ with minor modifications. After nuclei extraction, GpC methyltransferase (M.CviPI; New England Biolabs) reactions were performed in M.CviPI reaction buffer. GpC methyltransferase treatment was followed by DNA extraction, sodium bisulfite conversion, PCR amplification of the region of interest, cloning and sequencing of individual clones. 2×10^6 KG-1-Luc cells treated with different conditions were centrifuged for 5 min at $500 \times g$. Cell pellets were washed in ice-cold PBS, resuspended in 1 mL of ice-cold nuclei buffer [10 mM Tris (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, complemented with 1x protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich)], and incubated on ice for 10 min. Nuclei were recovered by centrifugation at $900 \times g$ for 5 min, washed twice in nuclei wash buffer [10 mM Tris (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, and 0.1 mM EDTA containing protease inhibitors], and resuspended in 200 μ L of $1 \times$ M.CviPI reaction buffer supplemented with 0.3 M sucrose, 160 μ M S-adenosyl-L-methionine (SAM) (New England Biolabs). At this step, between 4 μ g and 10 μ g of purified genomic DNA were recovered and generally 3 μ g were treated in 100 μ L with 100 units of M.CviPI for 15 min at 37 °C in 200 μ L final volume. In parallel an equal quantity of purified genomic DNA was incubated in 100 μ L without M.CviPI for 15 min at 37 °C in the same experimental conditions, to obtain the CpG methylation profile on the sequence of interest. Reactions were stopped by the addition of an equal volume of stop solution [20 mM Tris·HCl (pH 7.9), 600 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM EDTA, and 400 μ g/mL Proteinase K] and incubated at 55 °C overnight. DNA was purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.

Bisulfite conversion of 2 µg of DNA was performed with the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research).

Bisulfite-converted DNA was eluted with 12 µL of water and 8 µL were used for CMV amplification.

PCR amplification of bisulfite-treated DNA

The CMV promoter DNA amplification was carried out on 8 µL eluted bisulfite-treated DNA in 20 µL PCR reaction containing 1× KAPA2G Buffer A, 2.0 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 125 nM of each primer and 1.0 units KAPA2G™ Robust HotStart DNA Polymerase (KapaBiosystems) on a C1000 Touch™ thermal cycler at 95°C for 3 min followed by 95°C for 20 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec repeated 40 cycles and final extension at 72°C 1 min. PCR fragments were quality controlled by agarose gel electrophoresis.

The primers used for amplification of CMV are: forward, 5'-GGGGTTATTAGTTTATAGTTTATATATGGA-3'; reverse, 5'-AATACCAAAACAACTCCCATTAAC-3'.

Cloning and sequencing was carried out as described above except M13 PCR that was performed to amplify the cloned sequence in 20 µL PCR reaction containing 1× KAPA2G Buffer B, 2.0 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 125 nM of each primer and 1.0 units KAPA2G® Robust HotStart DNA Polymerase (KapaBiosystems) on C1000 Touch™ thermal cycler at 95°C 3min followed by 95°C for 20 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec repeated 40 cycles and final extension at 72°C 1 min.

Sequence alignment and analysis of CG and GC methylation levels

Genomic alignment and bisulfite sequence analysis was performed as previously described⁴⁷.

The BISMA software was used for CpG methylation analysis of primary bisulfite sequencing data from subcloned individual molecules³⁹. Typically in a lollipop-style map, red (CG) symbols indicate methylated cytosine while blue (CG) symbols represent unmethylated cytosines.

Methyl Viewer⁴⁸ was used to analyze GC methylation and thus nucleosome occupancy. Black symbols represent a methylated GpC and white symbols represent unmethylated GpC sites. The ratio of cytosine methylation in GpC is representative of the chromatin accessibility by M.CviPI and nucleosome occupancy.

The combined methylation status for each clone at CG (BISMA) or GC (Methyl Viewer) sites was assembled and graphically represented, where each row corresponds to one of the individual cloned alleles, and each column represents an individual CG or GC site.

The ratio of methylation (R) of CG and GC at a given position within the DNA sequence was calculated as follows: $R = [MCT/MCNT]$, where MCT is the percentage of Methylated base at the analyzed DNA sequence in the Treated sample, and MCNT is the percentage of Methylated base at the DNA sequence in Not Treated sample. Two independent experiments are reported in the Figure and graphics represent the mean value of three experiments and the standard error.

ChIP assays

Treated cells (10^7) were fixed in 1% formaldehyde for 10 min at RT and the crosslinking reaction was stopped by incubation with 0.125 M of glycine for 5 min at RT. After 5 min centrifugation at $2000 \times g$ at 4°C , cells were washed twice in cold PBS supplemented with Proteases Inhibitors Cocktail (Sigma-Aldrich). After centrifugation, cells were incubated 10 min at 4°C in a 1 mL of Lysis Buffer 1 (140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10% Glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% Triton X100 and PIC) followed by 5 min centrifugation at $2000 \times g$ at 4°C . Pellets were resuspended into 1 mL of Lysis Buffer 2 (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM Tris pH 8 and PIC) and incubated 10 min at 4°C followed by 5 min centrifugation at $2000 \times g$ at 4°C . Then, pellets were resuspended into 1.3 mL of Lysis Buffer 3 (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.1% Na- Deoxycholate and PIC) and sonicated at 4°C for 10 min using cycles of 30 s ON – 30 s OFF (Diagenode Bioruptor). Sheared chromatin was pre-cleared and incubated at 4°C overnight with 2 μg of the following primary antibodies: anti-H3K4me3 (C15410003, Diagenode), anti-H3K9me3 (C15410193, Diagenode), anti-H3K27me3 (C15410195, Diagenode), anti-NFkB p65 (39369, Active Motif), anti-SP1 (39059, Active Motif), anti-CREB (ab31387, Abcam), anti-RNAPol II (05-623-Z, Millipore) and non-specific IgG (ab37415, Abcam). Chromatin-antibody complexes were precipitated 2 hours at 4°C with protein A/G agarose beads (Thermo Scientific) and washed five times in Buffer 3 (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate) by centrifugations at $10\,000 \times g$. Samples were eluted and de-crosslinked by overnight incubation step at 65°C in 55 μL of 200 μM NaCl. Samples were treated 45 min with RNase A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and 90 min with Proteinase K (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); then DNA was purified by phenol-chloroform extraction. The immunoprecipitated DNA and input samples were analyzed by real-time qPCR using SYBR Premix Ex Taq (Takara) according to the manufacturer's instructions. Primers used for amplification were as follows: CMV(1); forward, 5'-GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG-3'; reverse, 5'-GG

CGTTACTATGGGAACATACGTC-3'; CMV(2); forward, 5'-GTGTATCATATGCCAAGTACGCCC-3'; reverse, 5'-TGTA
CTGCCAAGTAGGAAAGTCCC-3'; CMV(3); forward, 5'-AC
CATGGTGATGCGGTTT-3'; reverse, 5'-GCCAAAACAAAC
TCCCATTGACG-3'; CMV(4); forward, 5'-TCAACGGGACT
TTCCAA-3'; reverse, 5'-GCTTATATAGACCTCCCACCGT-3'; Luc+(5); forward, 5'-
CAGAATCGTCGTATGCAGTGA-3'; reverse, 5'-ACGGTAGGCTGCGAAATGTCC-3'; and Luc+(6); forward,
5'-GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT-3'; reverse, 5'-ACACCTGCGTCGAAGATGT-3'.

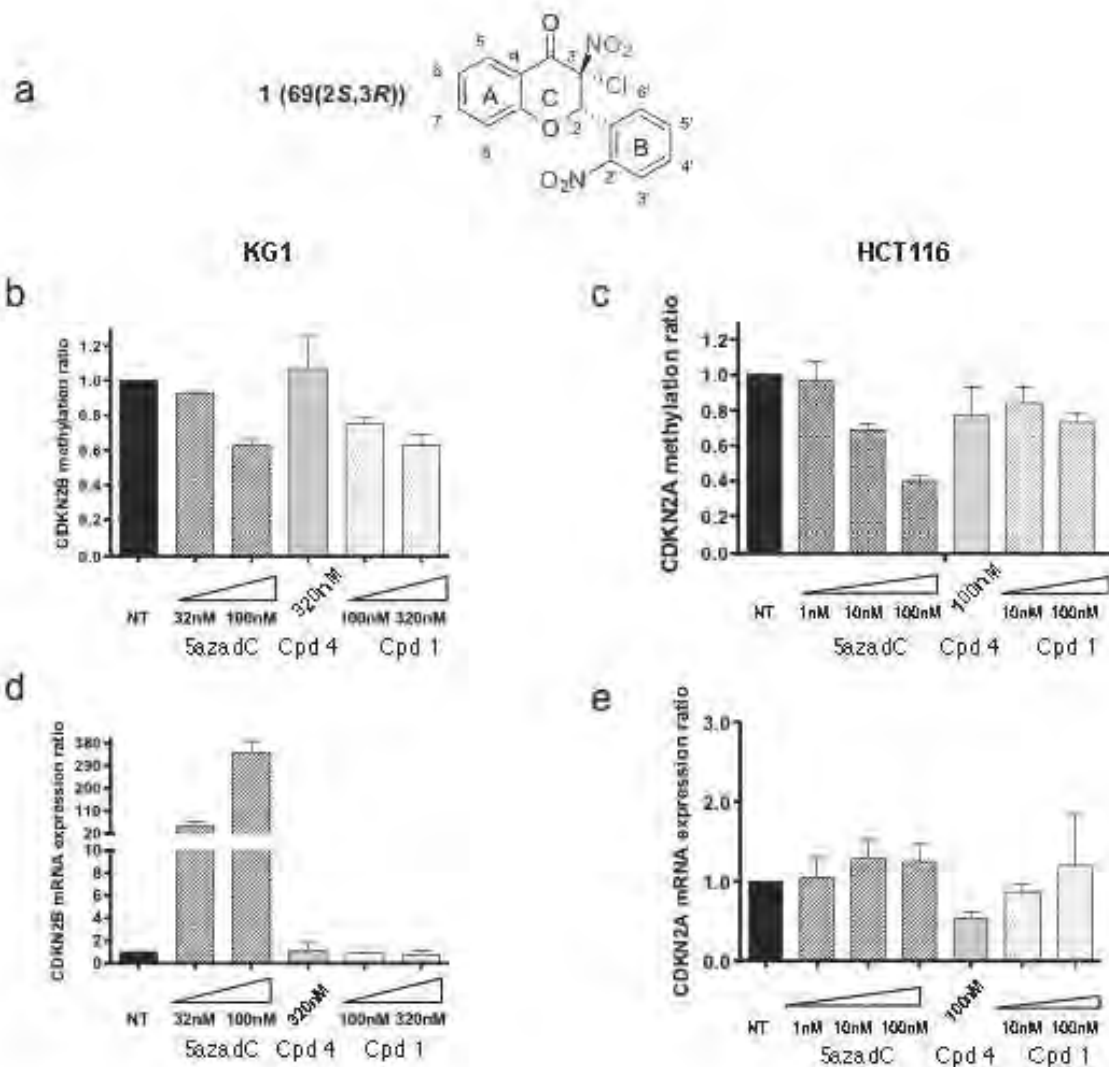
DNA methylome analysis

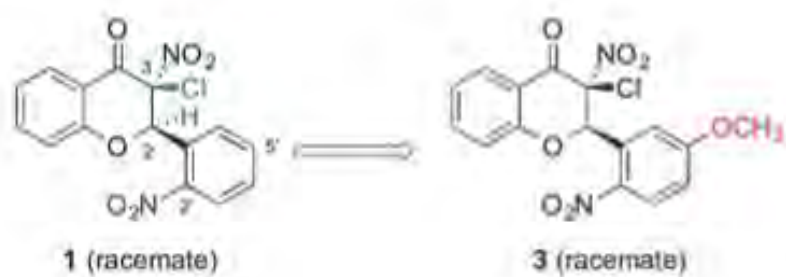
HCT116 cells were treated daily by compound **3** at 100 nM for 21 days. Cells were collected at day 3, 7 and 21 for analysis. After DNA extraction and treatment with sodium bisulfite, DNA methylation was analyzed by Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips according to the manufacture's instructions. Data was quality controlled and normalized using a refined version of the SQN pipeline⁴⁹. We selected genes with at least one CpG with a methylation difference (normalized β -values) between cells treated with compound **3** and control cells treated with 0.01% DMSO of at least 0.195. Only the genes that were demethylated by compound **3** were kept. For each time point, the corresponding demethylated gene list was analyzed with Qiagen's Ingenuity® Pathway Analysis software (IPA, <http://www.qiagen.com/ingenuity>).

Methylation data of HCT116 treated by 5azadC were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database with accession number GSE51815. We used the dataset from untreated HCT116 cells, sample GSM1253124 (baseline), and HCT116 cells treated with 0.3 μ M of 5azadC as described in reference³⁰. Three time point were analysed, at day 5 GSM1253125(d5), at day 14 GSM1253126 (d14) and at day 24 GSM1253127 (d24). For each time point, we selected genes with at least one CpG with a methylation difference (normalized β -values) between treated and non-treated cells of at least 0.195. The UCSC ref gene group and their position in relation to the CpG island annotation of Illumina bead chip is represented according to ³¹.

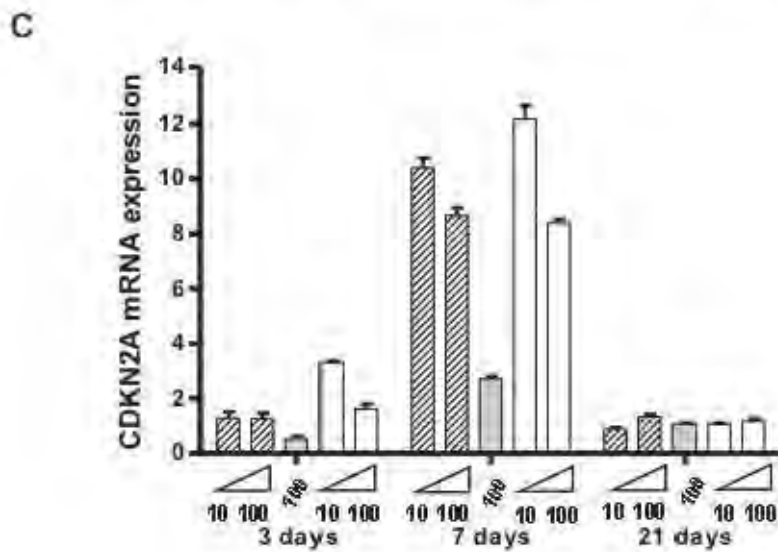
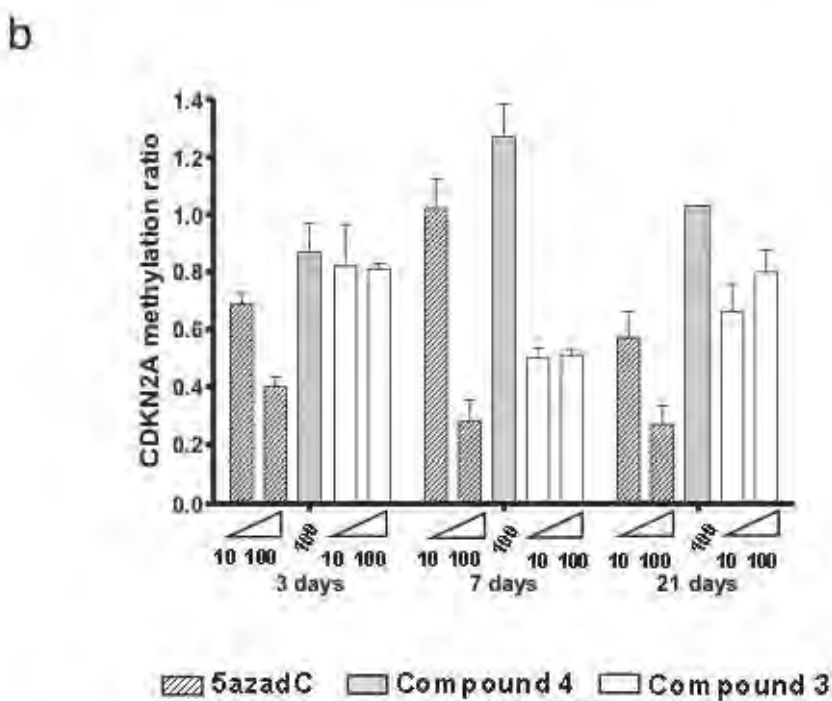
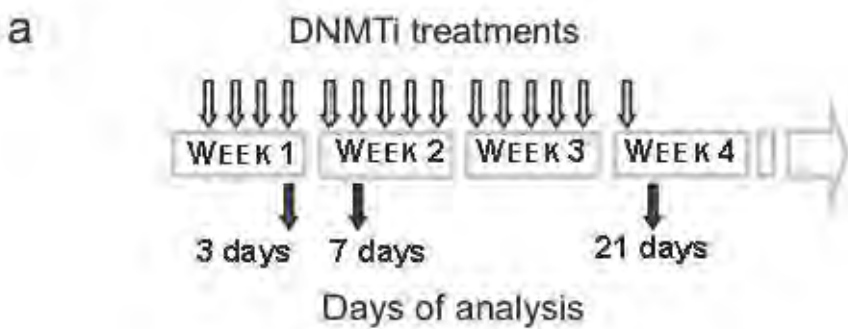
REFERENCES

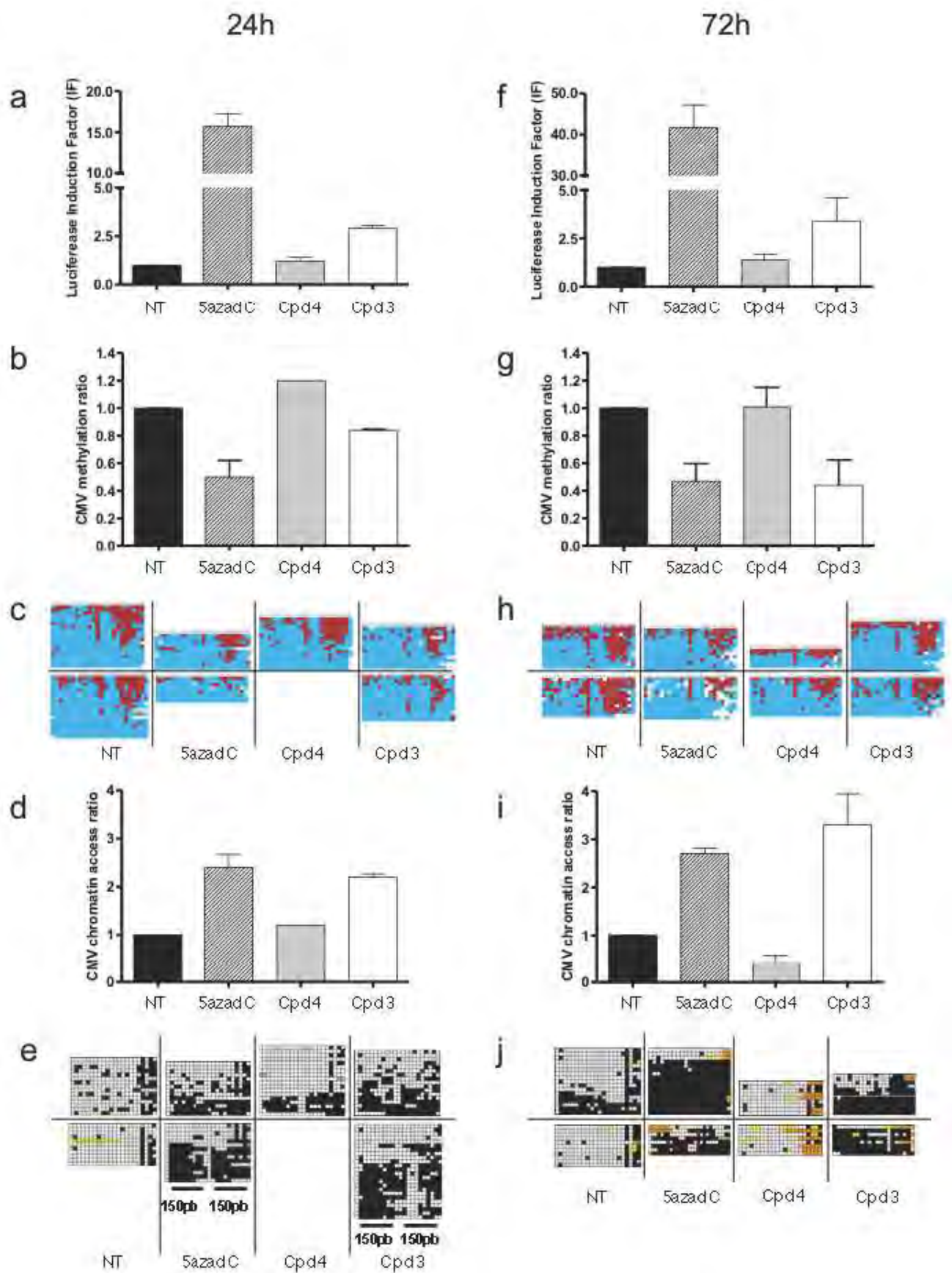
30. Yang, X. et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* **26**, 577-90 (2014).
31. Bibikova, M. et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* **98**, 288-95 (2011).
32. Lee, B.H., Yegnasubramanian, S., Lin, X. & Nelson, W.G. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J Biol Chem* **280**, 40749-56 (2005).
33. Gros, C. et al. Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies. *Nucleic Acids Res.* **41**, e185 (2013).
34. Gros, C. et al. Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e185 (2013).
35. Rilova, E. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 4-amino-N- (4-aminophenyl)benzamide analogues of quinoline-based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation. *ChemMedChem* **9**, 590-601 (2014).
36. Bauvois, B. et al. Synthesis and biological evaluation of novel flavone-8-acetic acid derivatives as reversible inhibitors of aminopeptidase N/CD13. *J Med Chem* **46**, 3900-13 (2003).
37. Koressaar, T. & Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289-91 (2007).
38. Untergasser, A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, e115 (2012).
39. Rohde, C., Zhang, Y., Reinhardt, R. & Jeltsch, A. BISMA--fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. *BMC Bioinformatics* **11**, 230 (2010).
40. Campan, M., Weisenberger, D.J., Trinh, B. & Laird, P.W. MethyLight. *Methods Mol Biol* **507**, 325-37 (2009).
41. Chan, K.C. et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* **52**, 2211-8 (2006).
42. von Kanel, T. et al. Quantitative 1-step DNA methylation analysis with native genomic DNA as template. *Clin Chem* **56**, 1098-106 (2010).
43. Hochedlinger, K. & Plath, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**, 509-23 (2009).
44. Sharma, S., Kelly, T.K. & Jones, P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27-36 (2010).
45. You, J.S. et al. OCT4 establishes and maintains nucleosome-depleted regions that provide additional layers of epigenetic regulation of its target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14497-502 (2011).
46. Kelly, T.K. et al. Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules. *Genome Res* **22**, 2497-506 (2012).
47. Berman, B.P. et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet* **44**, 40-6 (2012).
48. Pardo, C.E. et al. MethylViewer: computational analysis and editing for bisulfite sequencing and methyltransferase accessibility protocol for individual templates (MAPit) projects. *Nucleic Acids Res* **39**, e5 (2011).
49. Touleimat, N. & Tost, J. Complete pipeline for Infinium((R)) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* **4**, 325-41 (2012).

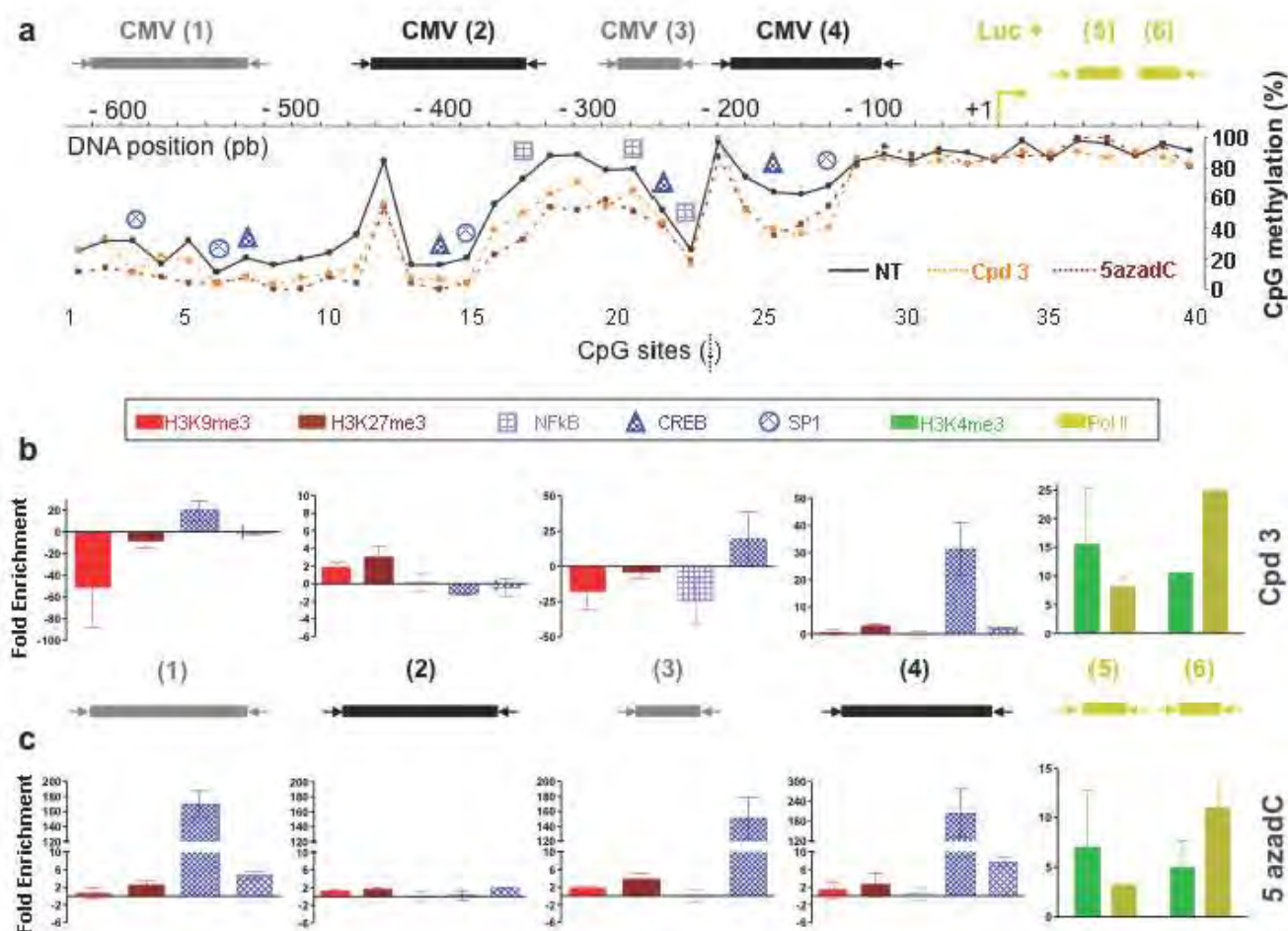


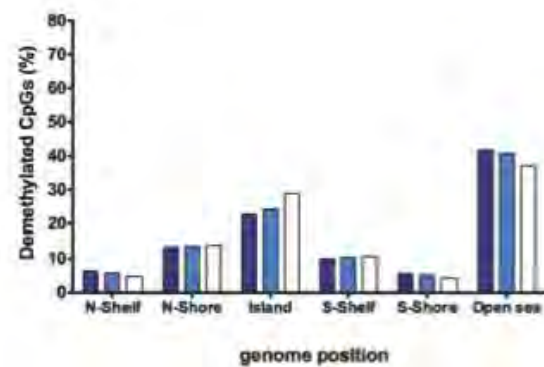
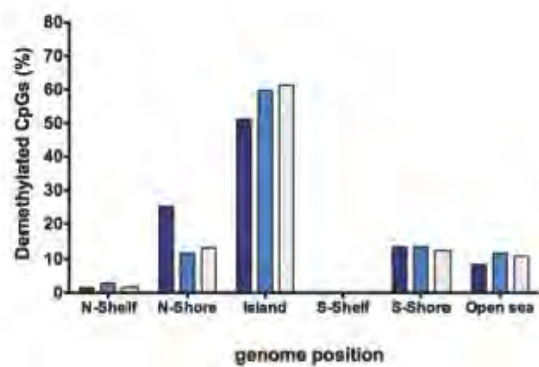
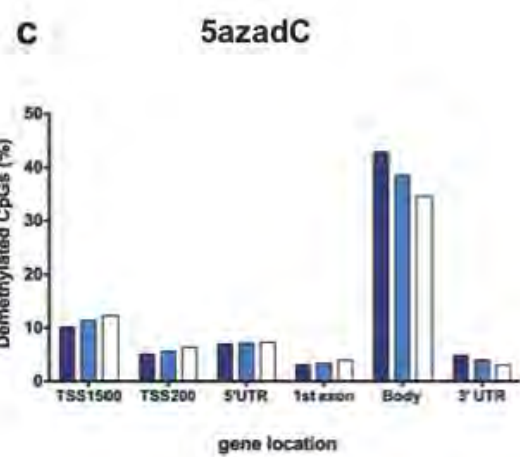
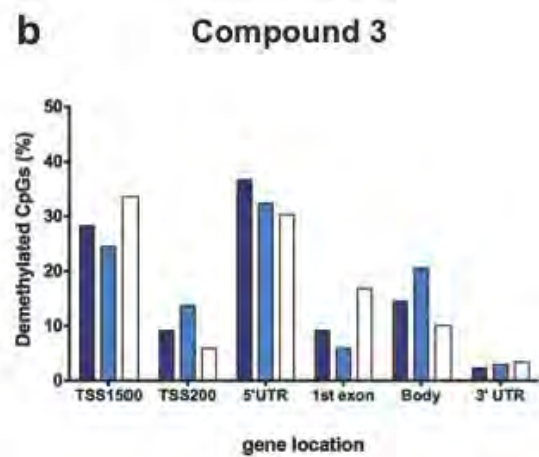
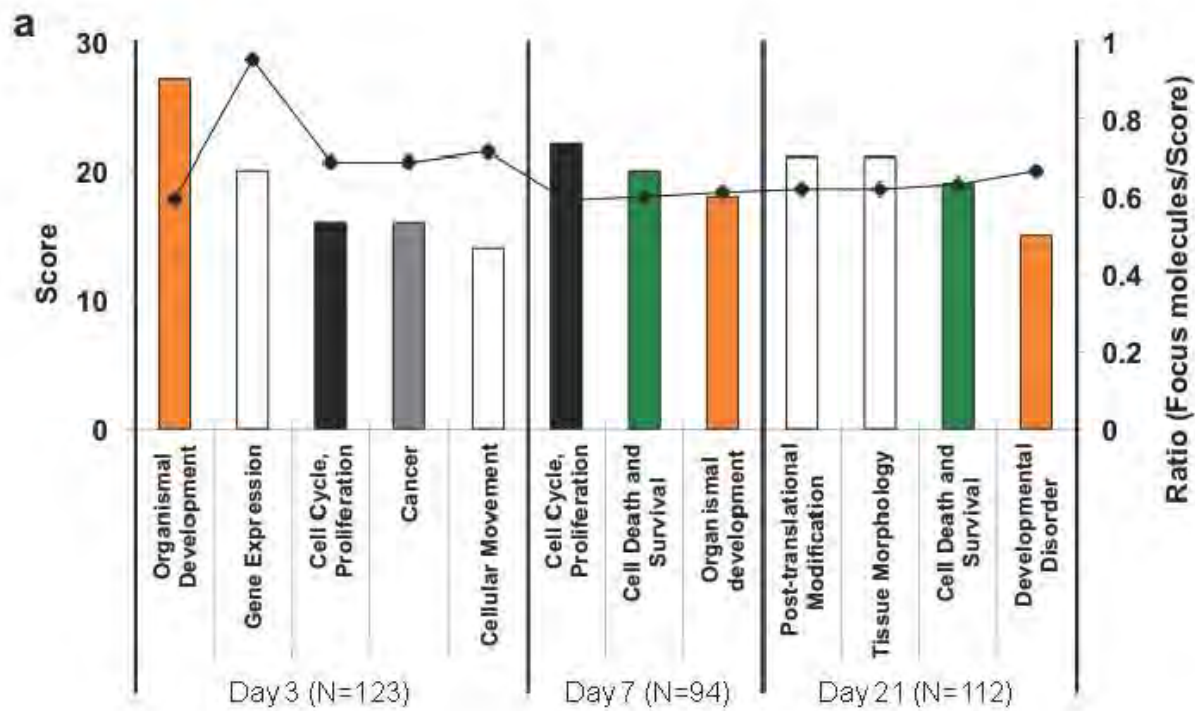


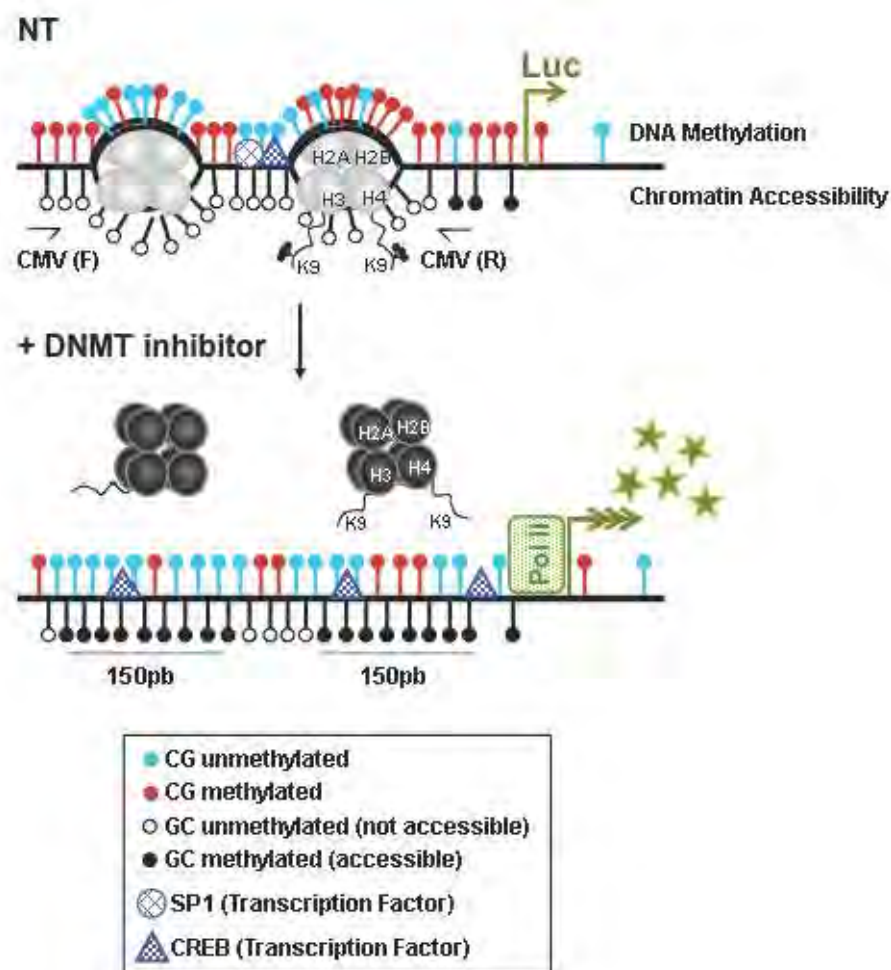
Compound	1	3
DNMT3A (EC50)	$2.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$	$0.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$
DNMT1 (EC50)	$12 \pm 4 \mu\text{M}$	$14 \pm 2 \mu\text{M}$
Product integrity at 2h in media	$50 \pm 8\%$	$76 \pm 1\%$







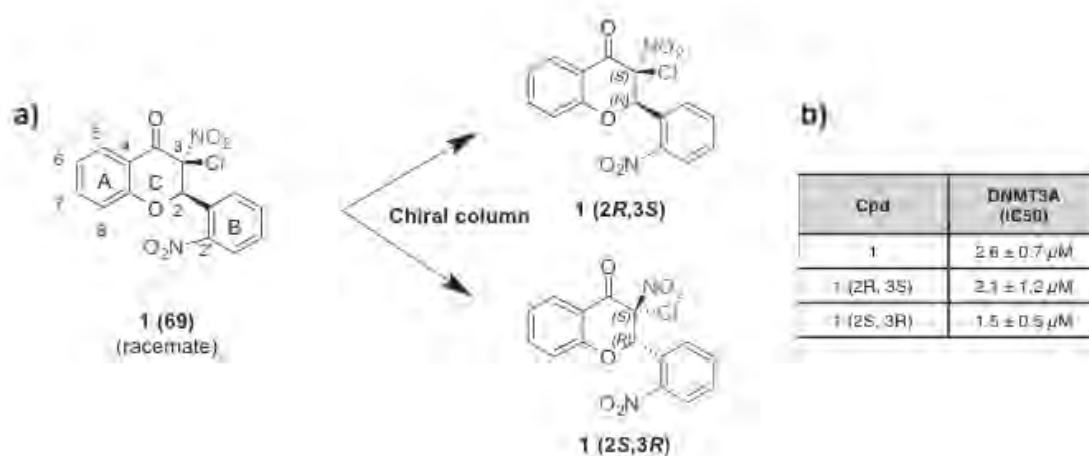




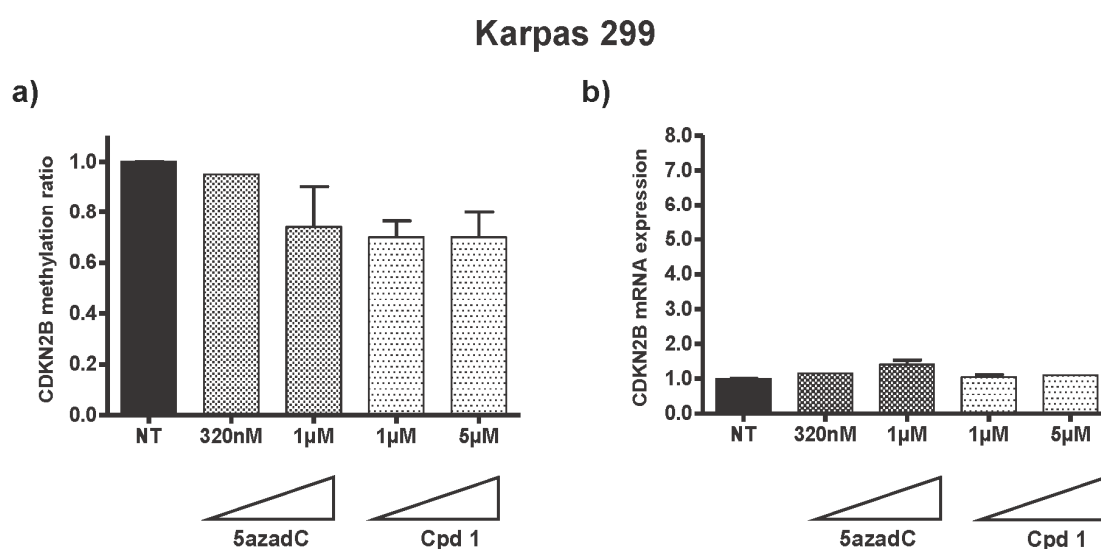
Supplementary Information

Epigenetic profiling of flavonoid inhibitors of DNA methyltransferases in cancer cells**Supplementary Figure 1 – Stereochemistry of compound 1.**

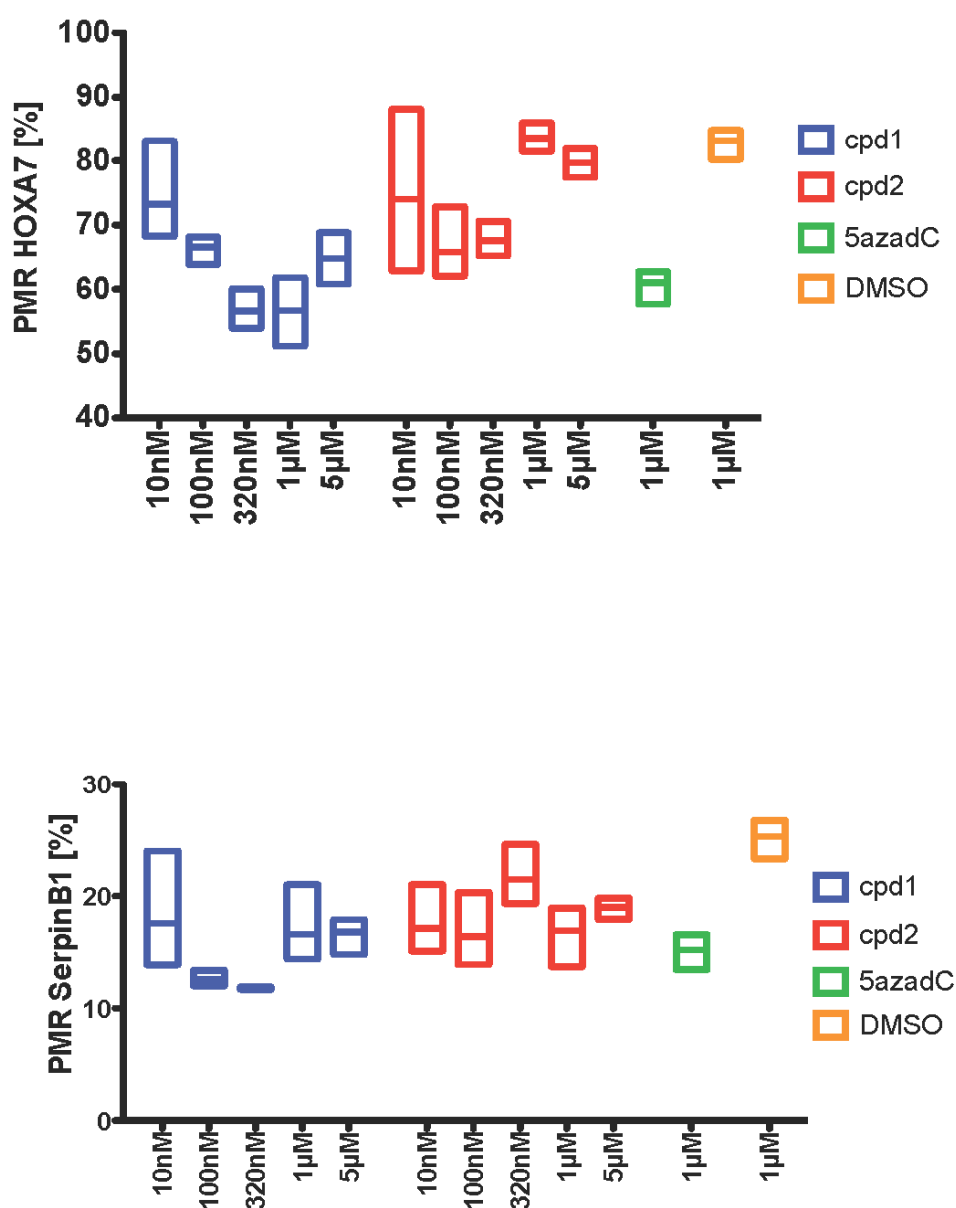
- a) Compound 1 (corresponding to compound 69 described in Ceccaldi *et al.* 2011) was purified on a chiral column to obtain the enantiomers (2R, 3S) and (2S, 3R), as verified by X-ray crystallography (data not shown).
- b) The ability of the racemic 69 and the two enantiomers to inhibit DNMT3A was evaluated: the three compounds showed a comparable inhibition. Enantiomer (2S, 3R) was thus selected for further experiments.



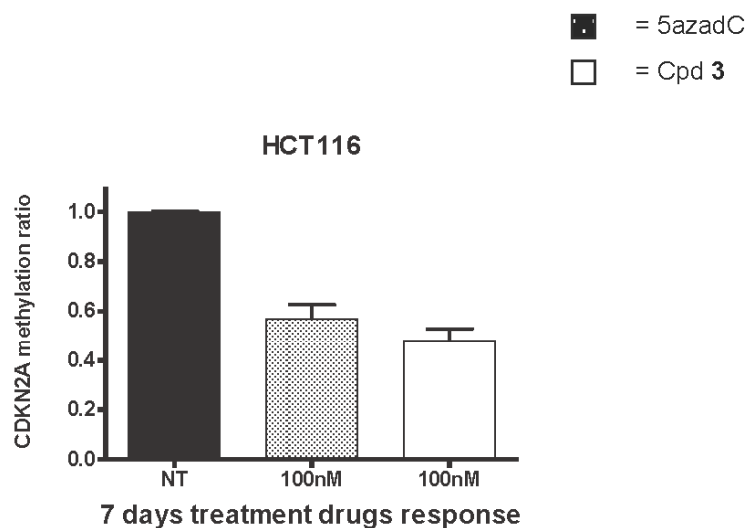
Supplementary Figure 2. DNA methylation and mRNA expression analysis after three days of treatment with compound **1** (dotted bars) and 5azadC (hatched bars) compared to non treated cells (black bars). (b) *CDKN2B* methylation status was monitored in Karpas299 cells by bisulfite conversion followed by cloning and sequencing. The methylation level is represented as ratio of treated cells over non treated and the mean value of at least two experiments is shown with the standard error. (b) mRNA expression levels of *CDKN2A* were analysed in Karpas299 by RT-qPCR. Data represents the mean values of the ratio of treated over non treated cells of at least two independent experiments.



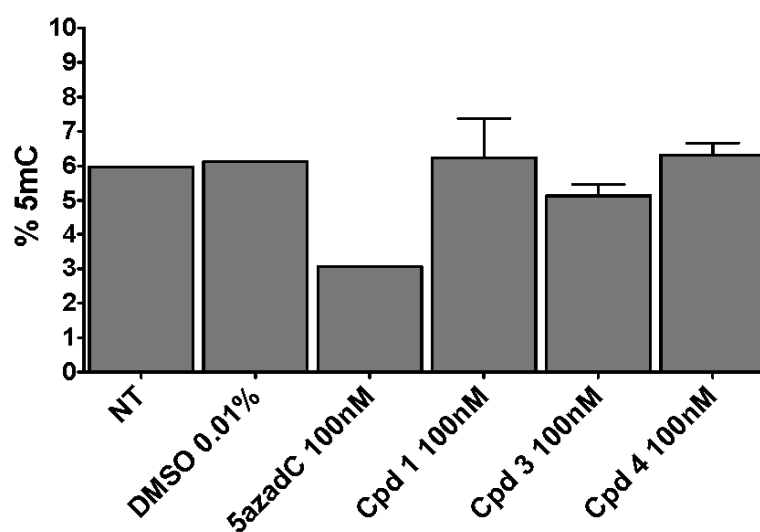
Supplementary Figure 3. DNA methylation analysis of *HOXA7* and *SERPINB1* in LNCaP prostate cancer cells. Cells were treated for three days with indicated inhibitor concentrations and methylation status was measured using methylation-specific qPCR. Inhibitor flavanone **1** (blue bars) was compared to inactive flavanone **2** (red bars), 5azadC (green bars) and DMSO control (orange bars). All treatments were performed in triplicates. The line within the boxes indicates the mean of three biological replicates and duplicate qPCR reactions, respectively.



Supplementary Figure 4. The *CDKN2A* methylation status in HCT116 cells was measured by MSRE-qPCR and reported as mean value of the ratio of treated to non treated (NT) cells after 7 days of treatment with 100 nM 5azadC (hatched bars) or 100 nM compound **3** (white bars).

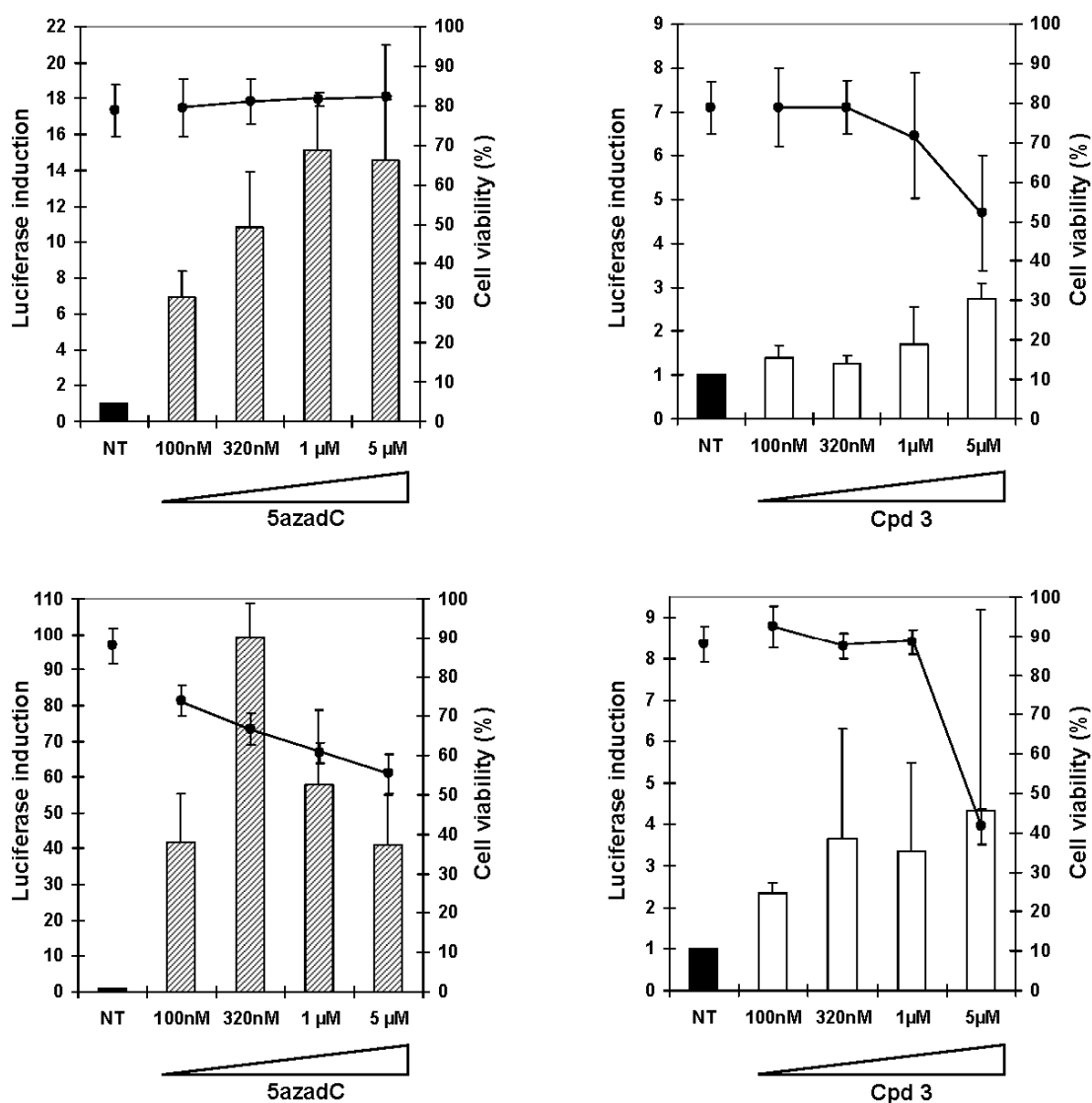


Supplementary Figure 5. The total amount of 5-methyldeoxycytidine (% 5mC) was measured in HCT116 cells treated with 100 nM of 5azadC, compound **1**, **3** and **4** for 10 days. LC/MS-MS was used as previously described in Desjobert C, El Maï M, Gérard-Hirne T, Guianvarc'h D, Carrier A, Pottier C, Arimondo PB, Riond J. *Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells* Epigenetics 2015;2;10(1):82-91.


















Supplementary Figure 6. Fold change in the luciferase gene reactivation using the KG1-Luc stable cellular construction. Luminescence was measured after treatment with increasing concentration of compounds **3** and 5azadC, from 100nM to 5 μ M, for **24h** (Top) or **72h** (Bottom). The luciferase induction factor is represented as ratio to non treated cells. The cellular viability was measured after treatment by counting of the trypan blue-marked viable cells and represented (right Y axis) together with the luciferase induction factor (left Y axis) at increasing concentrations of the drugs.

In Figure 4, we analysed the consequences of the treatment with 1 μ M of 5azadC (hatched bars) and 5 μ M of compound **3** (white bars) after 24 h and 100 nM of 5azadC (hatched bars) and 1 μ M of compound **3** after 72h.

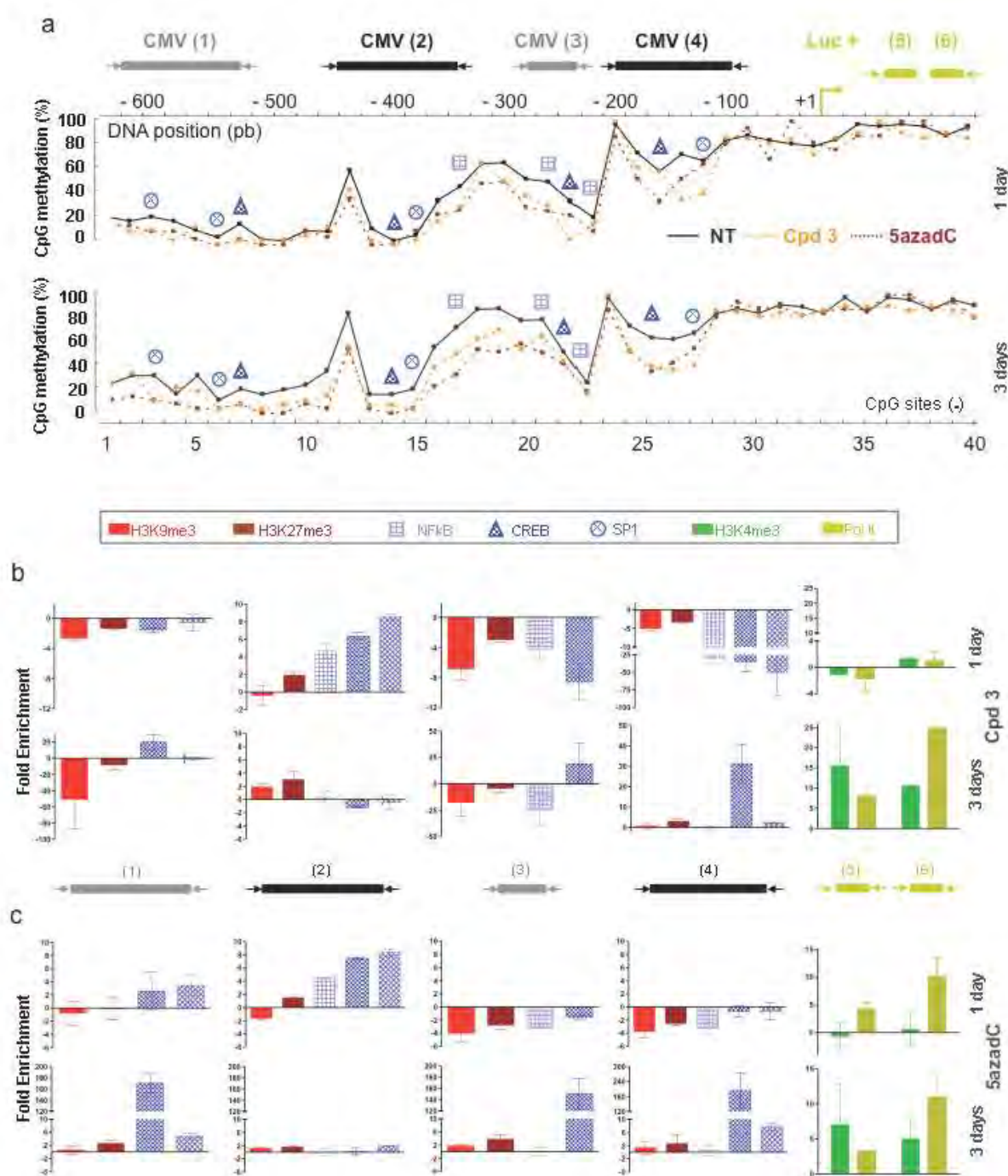


Supplementary Figure 7. ChIP Oligonucleotides' position on the CMV-Luc+ sequence stably integrated in the KG-1 leukemia cells are reported in the Table (top) and graphically positioned on the DNA sequence (bottom). The number of sequences for the binding of NFkB, CREB and SP1 are reported. In light green the SP1 binding sites; in blue the CREB binding sites and in pink the NFkB ones. The arrows indicate the forward and reverse primer for the amplification of the 1st CMV amplicon (in red, CMV (1)), the 2nd (in orange, CMV (2)), the 3rd (in green, CMV (3)) and the 4th (in cyan, CMV (4)).

	CMV (1)	CMV (2)	CMV (3)	CMV (4)	Luc+ (5)	Luc+ (6)
Amplicons Size (bp)	105	111	109	88	143	95
Positions to +1	- 606 to - 501	- 431 to - 320	- 298 to - 189	- 183 to - 95	+ 226 to + 369	+ 1309 to + 1404
NFkB 	0				nd	nd
CREB 					nd	nd
SP1 	 		0	 	nd	nd



Supplementary Figure 8. ChIP experiments to monitor histone modifications and transcription factor recruitment at the CMV promoter and the luciferase gene. (a) Non treated cells; (b) treated with compound 3 (5 μ M for 1 day and 1 μ M for 3 days) and (c) 5azadC (1 μ M for 1 day and 100 nM for 3 days).



Supplementary Table 1- List of UCSC ref genes that are demethylated by compound **3** at the different days of collection.

#	D3	D7	D21
1	<i>ABCA17P</i>	<i>ACSS1</i>	<i>ABCB4</i>
2	<i>ABCA3</i>	<i>ADAMTS5</i>	<i>ACP5</i>
3	<i>ABCB1</i>	<i>AKAP13</i>	<i>ADAP1</i>
4	<i>ACSS1</i>	<i>AMELY</i>	<i>ALDH1A2</i>
5	<i>ACTN2</i>	<i>ANK1</i>	<i>AMN1</i>
6	<i>ACVR2A</i>	<i>ASCL4</i>	<i>ARL5C</i>
7	<i>ADAM28</i>	<i>BASP1</i>	<i>ATP2B2</i>
8	<i>ADNP</i>	<i>BEGAIN</i>	<i>ATP8B1</i>
9	<i>AIFM3</i>	<i>BEX5</i>	<i>AUTS2</i>
10	<i>AKAP5</i>	<i>BIRC8</i>	<i>BASP1</i>
11	<i>ALDH1A2</i>	<i>C19orf47</i>	<i>BCAR3</i>
12	<i>AMOT</i>	<i>CCDC106</i>	<i>BCL2L11</i>
13	<i>ANKRD34B</i>	<i>CCHCR1</i>	<i>BCORL2</i>
14	<i>ARID5B</i>	<i>CLDN23</i>	<i>BLCAP</i>
15	<i>ARSG</i>	<i>CNTRF</i>	<i>C11orf70</i>
16	<i>ATP10B</i>	<i>CRYGD</i>	<i>C17orf102</i>
17	<i>B3GALNT1</i>	<i>DCC</i>	<i>C1orf187</i>
18	<i>BASP1</i>	<i>DIDO1</i>	<i>C20orf160</i>
19	<i>BHLHE23</i>	<i>DIO2</i>	<i>C20orf177</i>
20	<i>BIK</i>	<i>DOT1L</i>	<i>C22orf45</i>
21	<i>BIRC8</i>	<i>DYDC1</i>	<i>C9orf167</i>
22	<i>BOC</i>	<i>DYDC2</i>	<i>CDC42EP5</i>
23	<i>C10orf25</i>	<i>EBF3</i>	<i>CHIC1</i>
24	<i>C10orf72</i>	<i>EFEMP2</i>	<i>CLEC2L</i>
25	<i>C16orf13</i>	<i>EGR2</i>	<i>CNPY1</i>
26	<i>C1orf194</i>	<i>FBRSL1</i>	<i>CROT</i>
27	<i>CDH6</i>	<i>FSIP1</i>	<i>CTNND2</i>
28	<i>CDH8</i>	<i>GABRA5</i>	<i>DLK1</i>
29	<i>CENPT</i>	<i>GPRC5B</i>	<i>DMRTC2</i>
30	<i>CLDN11</i>	<i>GSC2</i>	<i>DOCK10</i>
31	<i>CLDN23</i>	<i>HAND2</i>	<i>DOT1L</i>
32	<i>CNKSR2</i>	<i>HECW2</i>	<i>DPM2</i>
33	<i>CPT1A</i>	<i>HIST1H3I</i>	<i>ELMO1</i>
34	<i>CYP4B1</i>	<i>HOXA5</i>	<i>EPB49</i>
35	<i>DACH2</i>	<i>IGDCC4</i>	<i>FAM123C</i>
36	<i>DAGLB</i>	<i>KCNA4</i>	<i>FAM131B</i>
37	<i>DBC1</i>	<i>KCNK13</i>	<i>FAM43B</i>
38	<i>DIP2C</i>	<i>KCNQ1DN</i>	<i>FBLL1</i>
39	<i>DLK1</i>	<i>KCTD16</i>	<i>FBN1</i>
40	<i>DMRT3</i>	<i>LHX8</i>	<i>FGF13</i>
41	<i>ESR1</i>	<i>LIMS2</i>	<i>FSTL4</i>
42	<i>EYA1</i>	<i>LITAF</i>	<i>GALC</i>
43	<i>FAM131B</i>	<i>LMF1</i>	<i>GJD3</i>
44	<i>FAM229A</i>	<i>LOC151174</i>	<i>GPR78</i>
45	<i>FARP1</i>	<i>LOC285696</i>	<i>GREM2</i>
46	<i>FATE1</i>	<i>LOC441666</i>	<i>GRM6</i>
47	<i>FOLH1</i>	<i>LOC643387</i>	<i>HCK</i>

#	D3	D7	D21
48	GABRA5	LPGAT1	HTR2C
49	GABRB2	LPHN2	IRAK3
50	GALNT9	MAGED1	ISLR2
51	GPR176	MIR1185-2	KAL1
52	GPR78	MIR432	KCNK10
53	GREM1	MNS1	KIFC3
54	HLA-J	MYO15B	LMF1
55	HMGB3	MYT1L	LOC100128164
56	ITGA8	NCRNA00200	LOC139201
57	KCND3	NEFM	LOC283731
58	KIAA1324	NID2	LOC285696
59	KRCC1	OTX2-ASI	LYPD4
60	LAMA1	PABPC4L	MAD2L2
61	LAMB1	PAK3	MATK
62	LBH	PCSK1N	MDFIC
63	LHFPL2	PDLIM5	MMP23A
64	LMO3	PLD3	MMP23B
65	LOC100286844	PRDM14	MOSPD1
66	LOC145845	PRDM8	NCOA2
67	LOC200726	PTPRD	NEFM
68	LOC285696	RAB3C	NNAT
69	LOC344967	RBFOX1	NPAS3
70	MAP9	RNF14	OR5AS1
71	MARK3	RTDR1	PHACTR1
72	MNS1	SBK1	POMC
73	MYT1L	SCGN	PPP1R3D
74	NCKAP5L	SF1	PTCHD2
75	NCRNA00029	SMOC2	PTPRM
76	ONECUT1	SOX1	QRFPR
77	PCDHB16	SOX2OT	RBM46
78	PIWIL1	SOX5	RELN
79	PIWIL2	SPATA22	SBNO2
80	PKNOX2	SPON2	SCNN1D
81	PLCXD3	SPON2	SCRN1
82	POMC	STK25	SEC62
83	PRDM8	SV2B	SEMA3F
84	PRKCG	SV2C	SEMA6D
85	RAI1	TBL1Y	SHISA7
86	RASGEF1B	TBX2	SKAP1
87	RBM46	TCF19	SLITRK5
88	RGS7	TMEM2	SNAPIN
89	RHOQ	UBN2	SNX12
90	RNF14	VAV3	SOX5
91	RNF180	ZFHX3	SPATA22
92	RNF38	ZNF10	SV2B
93	RUNDC3B	ZNF295	SYNE1
94	SEC31B	ZNF662	SYT10
95	SERHL2	ZNF853	TBC1D25
96	SF1		TBL1Y
97	SFRP1		TBX2
98	SLC16A6		TBX20

#	D3	D7	D21
99	<i>SLC3A2</i>		<i>TMEM132E</i>
100	<i>SNHG1</i>		<i>TMEM175</i>
101	<i>SNORD26</i>		<i>TP53TG1</i>
102	<i>SNORD27</i>		<i>TRIOBP</i>
103	<i>SNORD28</i>		<i>TRPM1</i>
104	<i>SNORD29</i>		<i>TSHZ3</i>
105	<i>TBX15</i>		<i>TSPAN9</i>
106	<i>TELO2</i>		<i>UPB1</i>
107	<i>THAP11</i>		<i>VASH1</i>
108	<i>TMEM19</i>		<i>WDR76</i>
109	<i>TMEM22</i>		<i>ZNF396</i>
110	<i>TMEM51</i>		<i>ZNF470</i>
111	<i>TNFRSF1B</i>		<i>ZNF737</i>
112	<i>TNFSF9</i>		<i>ZSWIM5</i>
113	<i>TSSK3</i>		
114	<i>TWIST1</i>		
115	<i>UBE2L3</i>		
116	<i>ZBTB16</i>		
117	<i>ZNF22</i>		
118	<i>ZNF542</i>		
119	<i>ZNF583</i>		
120	<i>ZNF667</i>		
121	<i>ZNF783</i>		
122	<i>ZNF790</i>		
123	<i>ZNF804A</i>		
124	<i>ZNF808</i>		

1.3. Remarques complémentaires

1.3.1. Méthylation spécifique et méthylation globale

Comme nous l'avons décrit dans nos travaux (Chapitre 5 § 1.2, [Menon *et al.*, soumis pour publication](#)) à travers l'analyse de plusieurs promoteurs de gènes spécifiques ([Figure 3](#) et [Supplementary Figure 3](#)) et une analyse du méthylome ([Figure 6](#)), il existe une différence dans l'action déméthylante de la 5azadC et de notre composé **3**.

Ces données montrent, au niveau des gènes, une déméthylation spécifique des séquences promotrices et du premier exon (80% à 90% selon les temps de traitement) avec le composé **3** ([Figure 6b](#)). Cette même analyse, avec la 5azadC, montre clairement une déméthylation plus marquée dans le corps des gènes (35% à 40% selon les temps de traitement) ([Figure 6c](#)). Par ailleurs, l'analyse de la répartition de la déméthylation au niveau du génome avec ces deux inhibiteurs, montre une déméthylation spécifique des îlots CpG et de leur voisinage (90%) avec le composé **3** ([Figure 6b](#)) tandis que la déméthylation observée avec la 5azadC est moins importante sur ces régions (60%) ([Figure 6c](#)).

Dans le but de compléter ces résultats, une analyse complémentaire de la méthylation globale a été réalisée par LC/MS-MS ([Supplementary Figure 5](#)). Celle-ci montre une légère déméthylation avec le composé **3** (10%) alors que l'effet avec la 5azadC est beaucoup plus marqué (50%). Ce résultat obtenu par une mesure physico-chimique confirme l'analyse faite à partir des résultats de méthylome. Nous avons enfin utilisé la méthode dite du COBRA pour analyser la méthylation des séquences répétées correspondants aux Longs éléments nucléaires intercalés (LINE), comme cela a été décrit dans la littérature (Yang *et al.*, 2004). Cette analyse révèle également, avec la 5azadC, une déméthylation de ces séquences LINE réparties dans tout le génome, ce qui n'est pas le cas avec le composé **3**.

La différence du mode d'action, pouvant expliquer ces résultats ainsi observés entre nos inhibiteurs catalytiques et la 5azadC, est discutée au Chapitre 6.

1.3.2. Modèle KG1 CMV-Luc et cinétique de traitement

Dans un premier temps, ce modèle nous a permis par une mesure directe de la luminescence, de réaliser un criblage, afin d'identifier facilement des molécules capables d'induire une expression du gène rapporteur utilisé (la luciférase) (Chapitre 4 § 1.2). Lorsque cela était positif l'état de méthylation du promoteur CMV pouvait ensuite être mesuré à l'aide de la technique du BCS.

Dans nos premières expériences nous avons ainsi utilisé ce modèle en nous basant sur le protocole de criblage, dans lequel les cellules sont traitées durant 24h avec les différents composés à tester ([Figure 4](#) et [Supplementary Figure 8](#)). Dans ce cas, nous obtenons de manière générale avec nos inhibiteurs catalytiques une induction de la luminescence pour des doses comprises entre 3.2µM et 10µM (voir pour exemples Chapitre 5 § 2.2, [Halby *et al.*, en préparation Table 4](#) ; [Rilova *et al.*, 2014, Table 2](#) et [Erdmann *et al.*, 2015b Table 4, Annexes 2 et 4](#)). Cependant, ces doses sont supérieures aux doses cytotoxiques déterminées pour ces composés à l'aide d'un protocole classique, basé sur trois jours de traitement ([Barret *et al.*, 2002](#)).

Dans le but d'évaluer les effets épigénétiques de nos composés à l'aide du modèle KG1 CMV-Luc, nous avons donc entrepris une démarche consistant à diminuer les doses utilisées en augmentant le temps de traitement jusqu'à trois jours. Nous avons, de cette manière, optimisé le protocole d'utilisation de notre modèle KG1 CMV-Luc ([Supplementary Figure 6](#)).

Cette approche nous a finalement permis d'utiliser pleinement ce modèle et de caractériser ainsi directement nos composés. Nous avons donc réalisé ceci en étudiant en parallèle, leur effet sur la ré-expression d'un gène, la méthylation et l'organisation de la chromatine, au niveau de la séquence promotrice contrôlant l'expression de ce gène ([Figures 4 et 5](#) et [Supplementary Figures 6, 7 et 8](#)).

2. Inhibiteurs de type bi-substrats

2.1. Contexte de l'étude

La question récurrente concernant les inhibiteurs de DNMT est leur mode d'action. Ces molécules peuvent agir soit comme inhibiteurs compétitif du cofacteur de l'enzyme (SAM), du substrat, des deux, ou encore par interaction avec l'ADN, comme peut le faire la procainamide ou les dérivés acridines (Chuang *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2013).

Dans le cadre de sa thèse de doctorat dans notre équipe, Ludovic Halby a conçu et synthétisé de nouveaux inhibiteurs des DNMT basés sur des molécules dites bi-substrats. Ces molécules possèdent à la fois un groupement mimant l'adénosine du SAM et un groupement se positionnant dans la poche cytidine des DNMTs. La liaison de ces deux groupements devant aboutir à un inhibiteur puissant qui se positionnerait dans chacune des poches des deux substrats de l'enzyme (Chapitre 5 §2.2, Halby *et al.*, en préparation, Figure 1).

Le but de ce projet était donc de réaliser une étude de SAR en vue d'obtenir des inhibiteurs ayant une très forte affinité pour l'enzyme. Cette étude de SAR a été réalisée en évaluant la capacité des composés synthétisés à inhiber l'activité de la DNMT3A *in-vitro*.

Les 3 composés les plus actifs sur l'enzyme ont ainsi été sélectionnés et leur capacité déméthylante a été évaluée au niveau cellulaire. L'effet des molécules a été analysé en particulier sur la méthylation de *CDKN2A* dans la lignée HCT116 de cancer colorectal et sur le promoteur CMV dans le modèle KG1 CMV-Luc.

Finalement, comme pour le composé 3-chloro-3-nitroflavone une analyse de l'effet de ces molécules sur l'ouverture de la chromatine a également été réalisée. Tout ce travail est décrit dans la publication ci-dessous.

2.2. Publication

Rational design of quinazoline-based DNMT inhibitors

Ludovic Halby, Yoann Menon, Elodie Rilova, Véronique Masson, Dany Pechalrieu, Celine Faux, Yannick Aussagues, Laurence Fleury, Natacha Novosad, Arnaud Samson, Frédéric Ausseil, Dominique Guianvarc'h, Clotilde Ferroud and Paola B. Arimondo

Rational design of quinazoline-based inhibitors of DNA methyltransferases

Ludovic Halby[‡], Yoann Menon[‡], Elodie Rilova[‡], Dany Pechalrieu[‡], Véronique Masson[‡], Celine Faux[‡], Natacha Novosad[‡], Yannick Aussagues[‡], Laurence Fleury[‡], Arnaud Samson[‡], Frédéric Ausseil[‡], Dominique Guianvarc'h[‡], Clotilde Ferroud[§] and Paola B. Arimondo^{‡*}

[‡] CNRS-Pierre Fabre USR3388 ETaC, Epigenetic Targeting of Cancer, CRDFP, 3 avenue H. Curien, 31035 Toulouse cedex 01, France

[‡] Laboratoire des BioMolécules, UMR 7203, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6 - ENS - CNRS, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

[§] Service de Transformations Chimiques et Pharmaceutiques, ERL CNRS 3193, Conservatoire National des Arts et Métiers, 2 rue Conté, 75003 Paris, France

* to whom correspondence should be addressed: paola.arimondo@etac.cnrs.fr

Epigenetic modifications participate to control gene expression. Methylation of deoxycytidines in the DNA was shown to play a key role in epigenetic regulation in mammals.^[1] It is the most stable epigenetic mark and occurs at CpG sites, which are grouped in islands and essentially located in promoters, repeated sequences and CpG island shores.^[2] Hypermethylation of promoters induces gene silencing, while hypomethylation is associated to gene expression.^[3] Enzymes responsible for DNA methylation are the DNA methyltransferases (DNMTs). Two families of catalytically-active DNMTs have been identified: DNMT1, mainly responsible for DNA methylation maintenance during replication, and DNMT3A and 3B, which perform *de novo* DNA methylation and support methylation maintenance. DNMTs add a methyl group on the carbon-5 position of the deoxycytidine at the CpG site in the DNA by using *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet) as methyl donor.^[4] Thus, the enzymes present two substrate: the deoxycytine that will be methylated and the AdoMet that gives the methyl group. Alteration of DNA methylation patterns lead to various diseases such as cancer.^[5] Cancer cells often present aberrant DNA methylation, in particular a specific hypermethylation of tumor suppressor genes is observed. Restoring their expression by inhibition of DNA methylation represents an attractive therapeutic strategy.^[6]

Several DNMT inhibitors have been described.^[6a] They are divided into two families: nucleoside and non-nucleoside analogs. The first are the most active ones. Two of them are FDA approved: 5-azacytidine (VidazaTM) and 5-aza-2'-deoxycytidine (Dacogene[®]). Despite their high efficiency, their poor bioavailability, their instability in physiologic media and their little selectivity restrict their use. Non-nucleoside analogues present various structures and mechanisms of action. Many of them were shown to target the enzymatic activity of the DNMTs but they lack of both specificity and potency. Here, we synthesized bisubstrate-type inhibitors and evaluated their activity against human DNMT1 and DNMT3A.

We first conceived bi-substrat analogs based on the schematic representation of the transition state in DNMTs catalytic site depicted in Figure 1 and we opted for the replacement of adenosine by base mimics. Inspired by the work of Hernequin *et al.* describing the design of tyrosine kinase inhibitors,^[7] aminoquinazoline moiety was chosen as adenosine analog. Then according to the study described by Wahhab *et al.*,^[8] who observed that a hydrophobic group on the amine at C4 position of the adenosine moiety of SAM analogs was favorable for DNMTs inhibition activity, the amino group in C4 position of the quinazoline was substituted by a phenyl propylamine. This quinazoline moiety was first coupled to the amine at C4 position of a cytosine moiety (**1**) and, second, in parallel, the cytosine was replaced by a quinoline moiety (**2**) inspired by the DNMT inhibitor SGI1027^[9] (Figure 1). This latter substitution was guided by docking studies of SGI1027 in the DNMT catalytic pocket suggesting that the quinoline group fits within the cytidine pocket,^[10] in contrast to

previous results published by Yoo *et al.*^[11] (Figure 1) We also attempted to reduce the flexibility of the linker to form a bioactive conformer. Indeed, in certain cases, constrained analogues induce an increase in the inhibitory activity due to the restriction of the conformational flexibility that reduces entropy.^[12] This strategy was successfully used by Castellano *et al.* in the synthesis of constrained analogues of procainamide, a DNMT inhibitor^[13] and by us to develop potent derivatives of RG108, a described inhibitor of DNMT1.^[14] Accordingly, a constrained linker containing a piperidine moiety was used to design analogues **3** and **4**.

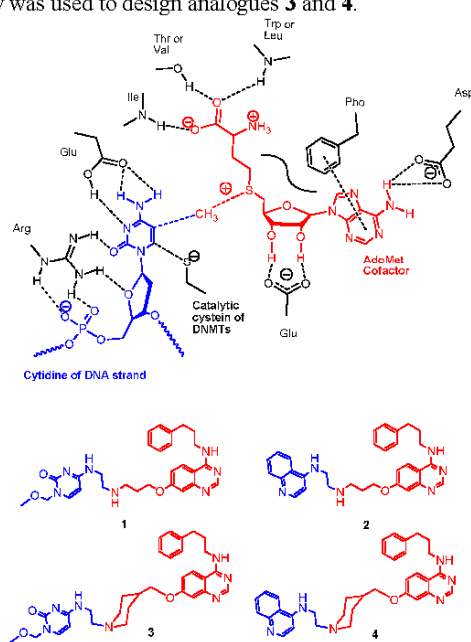
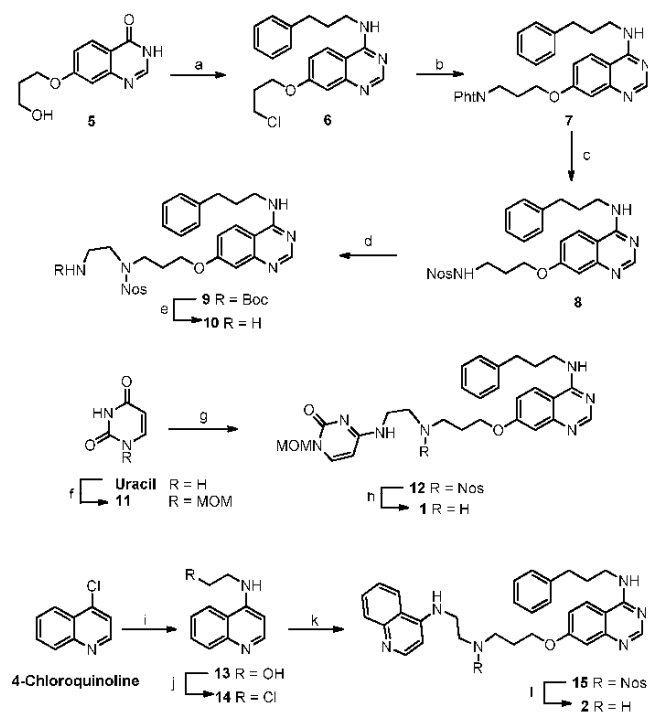


Figure 1. Schematic representation of the catalytic pocket of the DNMT 1 and DNMT3A and first synthesized compounds. 4-aminoquinazoline was coupled to a cytosine moiety (**1** and **3**) and to a quinoline one (**2** and **4**). In red is depicted the methyl-donor AdoMet and its analog the 4-aminoquinazoline, and in blue the deoxycytidine in the DNA and its analog the 4-aminoquinoline.

The synthesis of quinazoline derivatives **1** and **2** is reported in scheme 1 and the one of derivatives **3** and **4** in Scheme 3. Compound **1** and **2** were obtained from key compound **8** that was synthesized from quinazolone **5** as previously described.^[15] (Scheme 1) The alcohol functionality and quinazolinone groups of **5** were chlorinated in a single step using hot thionyl chloride and coupled to phenylpropylamine to form quinazoline derivative **6** in 85% overall yield. Upon activation by phthalimide it lead to compound **7**. Then

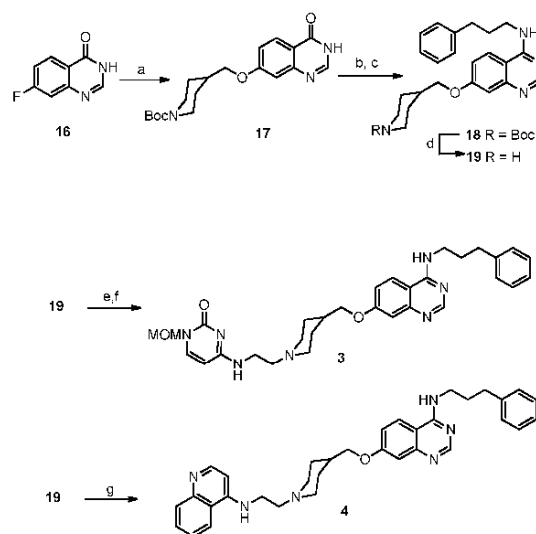
methylhydrazine treatment followed by protection of the resulting amine by 2-nitrophenylsulfonyl chloride afforded quinazoline derivative **6** in good yields. Starting from quinazoline **8**, compound **10** was obtained by *N*-alkylation with 2-(Boc-amino)ethyl bromide followed by TFA treatment. Then, to obtain compound **1** the *N*-1 nitrogen atom of uracyl was functionalized with methoxymethyl group to afford **11**, then converted to cytosine and coupled to **10** upon use of triazole/ POCl_3 in presence of triethylamine to provide compound **12** in good yield. **12** was finally treated with thiophenol to give the desired compound **1**. Compound **2** was synthesized by coupling quinazoline **8** and quinoline **14**, obtained by reaction of 5-chloroquinoline with ethanolamine to afford 4-(2-hydroxyethylamino)quinoline **13**, which was then treated with thionyl chloride by flash boiling.



Scheme 1. Synthesis of **1** and **2**. a) (i) SOCl_2 , 110°C , 1h; (ii) Phenylpropylamine, DMF, K_2CO_3 , RT, 2h, 85%. b) Phthalimide potassium salt, DMF, 90°C , 3h, 98%. c) (i) CH_3NHNH_2 , ethanol, RT, 18h, 82%; (ii) NOSCl , TEA, DMF, RT, 6h, 96%. d) 2-(Boc-amino)-ethyl bromide, TEA, DMF, 65°C , 12h, 92%. e) TFA, RT, 0.5h, 96%. f) MOMCl, BSA, DCM, RT, 18h, 93%. g) (i) POCl_3 , triazole, TEA, MeCN, 18h; (ii) **8**, TEA, DMF, RT, 6h, 54% over 2 steps. h) PhSH , K_2CO_3 , DMF, RT, 12h, 73%. i) Ethanolamine, 125°C , 4h, quantitative yield. j) SOCl_2 , DMFcat, flash boiling, quantitative yield. k) (i) **6**, K_2CO_3 , KI, DMF, 90°C , 12h, 74%; (ii) PhSH , K_2CO_3 , DMF, RT, 24h, 91%.

Derivatives **3** and **4** were synthesized starting from quinazoline **18** (Scheme 2). 7-fluoroquinazolinone **16**, obtained as previously described by Hennequin *et al.* [7] was reacted with *N*-Boc-piperidinemethanol to afford quinazolinone **17** that was converted to aminoquinazoline **18** in basic conditions according to the a 2-steps procedure used in pyrimidine chemistry, implying the formation of a 4-triazylquinazoline intermediate (b), followed by the substitution with phenylpropylamine (c). [16] Then Boc-deprotection of compound **18** with TFA afforded derivative **19**, that was *N*-alkylated with 2-(Boc-amino)ethyl bromide followed by TFA treatment to afford

compound **3** or with quinoline **14** in presence of the K_2CO_3 to give the desired product **4**.



Scheme 2. Synthesis of compounds **3** and **4**. a) *N*-Boc-4-methanollpiperidine, NaH, DMF, 110°C, 3h, 67%. b) POCl₃, triazole, TEA, MeCN, RT, 18h. c) 3-phenylpropylamine, TEA, DMF, RT, 2h, 80% over two steps. d) TFA, RT, 1h, 86%. e) (i) 2-(Boc-amino)-ethyl bromide, TEA, DMF, 65°C, 2h; (ii) TFA, RT, 1h. f) (i) **11**, POCl₃, triazole, TEA, MeCN, 18h; (ii) TEA, DMF, RT, 2h, 23% over 3 steps. g) **14**, K₂CO₃, KI, DMF, 65°C, 12h, 80%.

These four conjugates were tested for their ability to inhibit the methylation of a DNA duplex containing a single CpG site by human catalytic DNMT3A2 and human full length DNMT1 using the assays previously developed.^[17] (Table 1) SGI-1027 was used as positive control as it was previously described as DNMT inhibitor.^[9] Compound **1** bearing a cytosine moiety showed no activity, while the piperidine-containing derivative **3** showed a weak inhibition of DNMT3A (44% at 32μM). This inhibition activity increased with the replacement of cytosine by quinoline as in compound **2** (59% at 10μM) and, most interestingly, in the constraint compound **4** (81% inhibition at 10μM). Derivative **4** also inhibited 91% of the DNMT1 activity at 100μM. The difference in concentration used in the two assays is due to the difference in sensitivity of the assay.^[17b] Compared to the reference non-nucleoside DNMT inhibitor, SGI-1027, quinazoline-quinoline conjugate **4** inhibits the DNMT3A with an efficacy of 100% while SGI-1027 presented a maximum of inhibition efficacy of 70%.

Table 1. Biological activity of compounds 1 to 4. Inhibition of human DNMT1 and human catalytic DNMT3A are reported as mean value of the % of inhibition at the indicated concentrations.

Cpds	DNMT3A		DNMT1	
	32μM	10μM	100μM	32μM
SGI 1027	72	70	100	100
1	0	0	0	0
2	85	59	90	0
3	44	10	11	0
4	98	81	91	25

Since the presence of the constrained piperidine linker and the quinazoline moiety were associated to strong inhibition of the

DNMTs, we explored compound **4** by modulating (i) the linker between the quinoline and quinazoline moieties (depicted in yellow in Figure 2); (ii) the quinazoline moiety (in red); (iii) the quinoline moiety (in blue) and (iv) the hydrophobic substituent (in green).

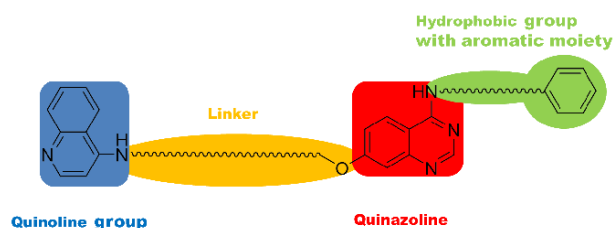
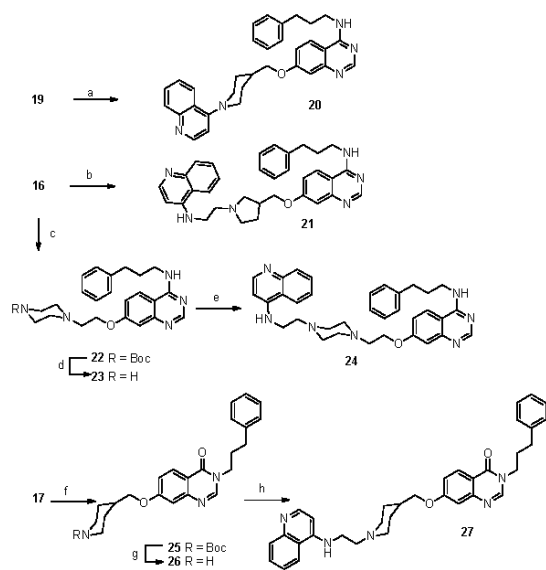


Figure 2. Graphical representation of the chemical modulation starting from compound **4**.

First, the linker was explored by removing the aminoethyl linker to give the more rigid compound **20** (Scheme 3) or replacing the piperidine by a pyrrolidyl in compound **21** or a piperazine in derivative **24**. The quinazoline motif was also replaced by quinazolinone in compound **27**.



Scheme 3. Synthesis of derivatives **20**, **21**, **24** and **27**. a) 4-chloroquinoline, K_2CO_3 , DMF, $90^\circ C$, 12h, 12%. b) (i) *N*-Boc-4-methanolpyrrolidine, NaH, DMF, $110^\circ C$, 3h, 60%. (ii) $POCl_3$, triazole, TEA, MeCN, RT, 18h. (iii) 3-phenylpropylamine, TEA, DMF, RT, 2h, 63% over two steps. (iv) TFA, RT, 1h, 76%. (v) **14**, K_2CO_3 , KI, DMF, $65^\circ C$, 12h, 31%. c) 2-chloroethanol, d) TFA, RT, 1h, 92%. e) **14**, K_2CO_3 , KI, DMF, $65^\circ C$, 12h, 15%. f) 4-(2-chloroethyl)benzene, K_2CO_3 , KI, DMF, $65^\circ C$, 12h, 95%. g) TFA, RT, 1h, 83%. h) **14**, K_2CO_3 , KI, DMF, $65^\circ C$, 12h, 28%.

Synthesis of compound **20** was done by aromatic substitution of the chloride atom of 4-chloroquinoline by **19** (Scheme 3). Compound **21** and **24** were obtained from **16** by using, respectively, 1-Boc-3-pyrrolidinemethanol or piperazine derivative **23**, obtained by *N*-alkylation of Boc-piperazine **22** by 2-chloroethanol. Quinazolinone **27** was synthesized from intermediate **17**. This latter was *N*-alkylated by 4-(2-chloroethyl)benzene to afford **25** that was deprotected to

obtain **26**. The *N*-alkylation of **26** by **14** in the presence of K_2CO_3 gave the desired product **27**.

The four derivatives of compound **4**, **20**, **21**, **24** and **27**, were tested against DNMT1 and DNMT3A (Table 2). Analogue **20** completely lost the capacity to inhibit DNMTs clearly suggesting that a short flexible linker between the quinoline moiety and the piperidyl linker is crucial for activity. Compared to the lead compound **4**, the pyrrolidyl and piperazinyl linkers and the replacement of the quinazoline moiety by a quinazolinone induced a decrease in the DNMT inhibition activity underlining the importance of the piperidine and quinazoline moieties.

Next, we kept the amino-substituted quinazoline (in red and green in Figure 2) and the piperidine linker and modulated the quinoline moiety (in blue in Figure 2) that mimics the cytosine. A naphthyl group was used (α - and β -naphthyl, compounds **28** and **29**) to determine the importance of the nitrogen atom of the quinoline. Then the nitrogen atom was moved or externalized (compounds **30** to **36**). Mono-cycloaromatics were tested (**37** to **39**) together with various substitutions of the quinoline moiety (**40** to **49**). Finally the C4 amino group was methylated (**50**). In total, 23 new derivatives were obtained.

All these new analogues were synthesized following the same pathway used to afford compound **4** (Scheme 4A) by *N*-alkylation of **19** using the corresponding 2-chloroethylamine derivatives of quinoline, naphthyl, pyridine or aniline in the presence of K_2CO_3 . Compounds **46** and **48** were obtained from compounds **45** and **47** respectively by action of BBr_3 . Compounds **28** to **50** were screened for their ability to inhibit DNMT1 and DNMT3A. (Table 2)

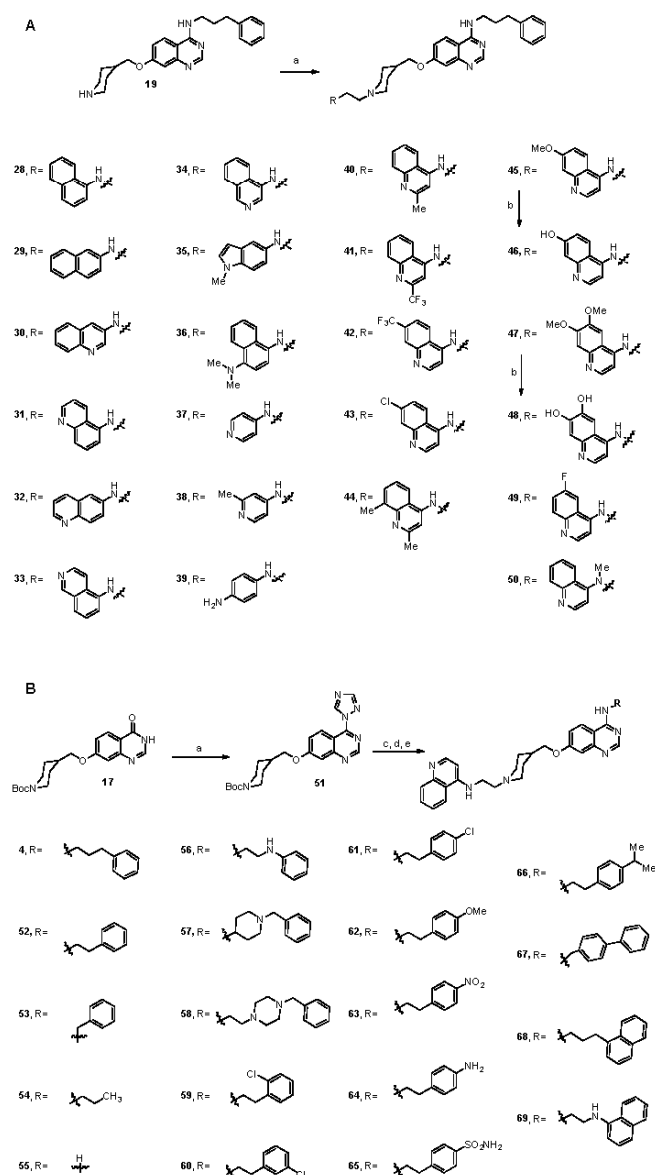
The naphthyl **28**, **29** and isoquinoline derivatives **33** were inactive, while the quinoline and isoquinoline derivatives **30**, **31** and **32** showed some inhibition of DNMT3A. These results stressed the importance of the presence of a nitrogen atom in the bicyclic aromatic group and it must be on the cycle bearing the linker or directly attached to it. Quinoline **4** conserved the best activity, with the nitrogen atom in “*para*” of the linker. This atom can be positioned externally to the aromatic ring as demonstrated by the inhibitory activity of compounds **35** and **36**. Moreover, this was further confirmed by monocycle derivatives **37**, **38** and **39**, which maintained a fair inhibitory activity. Still the monocycle is penalizing compared to a bicycle heteroaromatic group, thus we maintained the quinoline and studied its functionalization through position C4. Derivatives **40** to **49** showed a good activity except for the trifluoromethyl-substituted **41** and **42** that resulted inactive. Interestingly, compounds **40** and **47** started to show an slight increase in the inhibition activity, especially against DNMT1, compared to parent compound **4**. Finally, the decrease of activity of compound **50** that was attached through a methylamine of the C4 position instead of an amine on compound **4** indicated the importance of a secondary amine group at this position.

Last, the role of the hydrophobic group on position C4 of the quinazoline moiety (in green in Figure 2) was investigated by modulating the phenylpropylamine group. Twenty derivatives were obtained by varying or substituting the alkyl chain or the aromatic ring. (Scheme 4B) They were synthesized by following the same synthetic pathway to obtain inhibitor **4** from quinazolinone **17** with the difference that the triazol intermediate **51** was isolated to be reacted specifically with the corresponding substituent.

The length of the linker between the amino group of the quinazoline and the phenyl was varied by two carbon atoms (compound **52**) or one carbon atom (compound **53**). Compound **52** with two carbon atoms presented the same inhibition activity as

compound **4**, while the shorter linker induced a drastic loss of activity. Consequently, only propyl or ethyl linker between the quinazoline and the phenyl group can be used.

Compound **54**, bearing a propyl group, and derivative **55**, containing unsubstituted quinazoline, induced a decrease in the activity especially against DNMT3A, confirming that the hydrophobic group contributes to the inhibitory activity. This result is in agreement with the findings of Wahhab *et al.* on SAH analogs.^[8b] Aminoethylaniline **56** showed a similar activity against DNMT3A as compound **4** and an increase of activity against DNMT1 at 32μM showing the importance of the NH group in alpha of the aromatic group. Introduction of a cycle into the linker as a piperidine (**57**) or piperazine (**58**) induced a decrease in the activity against DNMT1.



Scheme 4. A) Synthesis of derivatives by varying the quinoline moiety. a) **14** analog, K₂CO₃, KI, DMF, 65°C, 12h., b) BBr₃, DCM. B) Synthesis of derivatives by varying the hydrophobic moiety. a) POCl₃, triazole, TEA, MeCN, RT, 18h. b) appropriate amine, TEA, DMF, RT or 65°C, 2h to 6h. c) TFA, RT, 1h. d) **14**, K₂CO₃, KI, DMF, 65°C, 12h

Table 2. Chemical structure and biological activity of derivatives **28** to **68**. Inhibition of human DNMT1 and human catalytic DNMT3A are reported as mean value of the % of inhibition at the indicated concentrations.

Cpds	DNMT3A		DNMT1	
	32μM	10μM	100μM	32μM
SGI-1027	72	70	100	100
4	98	81	91	25
20	0	0	6	0
21	81	37	100	0
24	67	37	83	0
27	99	65	90	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	45	38	12	0
31	60	50	0	0
32	60	47	16	0
33	0	0	0	0
34	49	35	0	0
35	90	74	50	21
36	77	66	15	8
37	72	47	34	ND
38	58	26	55	13
39	65	37	0	0
40	100	89	100	83
41	0	0	13	0
42	0	0	48	0
43	62	70	79	33
44	82	81	99	33
45	80	70	90	35
46	72	74	59	0
47	95	95	81	57
48	93	66	81	36
49	82	0	79	0
50	66	53	57	10
52	99	80	98	38
53	81	43	26	22
54	69	28	95	0
55	68	16	99	0
56	95	76	93	61
57	93	72	81	65
58	88	62	71	0
59	100	0	97	42
60	91	82	97	0
61	100	88	97	75
62	91	77	100	82
63	74	54	72	0
64	96	68	97	59
65	93	0	100	59
66	83	53	8	0
67	83	86	69	24
68	60	96	100	100
69	90	91	94	86

ND= not determined

Next, we explored the substitutions at the aromatic ring. *Ortho* substitution by chloride in compound **59** induced a decrease in the inhibition of DNMT3A at 10μM. *Meta* substitution in derivative **60** resulted into a potent inhibitor of DNMT3A, with an EC₅₀ of 4.7μM and a loss of DNMT1 inhibition. (Table 2) The chloride atom in *para* position (compound **61**) clearly enhanced the inhibition of DNMT1

at 32 μ M and inhibited DNMT3A with an EC_{50} of 1 μ M. A methoxy group in *para* position (**62**) or an amine (**64**) gave a good inhibition, while the presence of a sulfonamide group (**65**) induced a loss of inhibition of DNMT3A. A nitro group as substituent (**63**) decreased the inhibition activity against both DNMT3A and 1. Interestingly, isopropyl derivative **66** induce a weak loss of activity against DNMT3A, while it was completely inactive against DNMT1, indicating the possibility to design selective inhibitors of each DNMT isoform.

Last, the size of the hydrophobic group was drastically enlarged. Phenylbenzyl, propyl naphthalene and *N*-ethylnaphthalen-1-amine substituents were explored. Biphenyl **67** showed a good inhibition of DNMT3A at the micromolar range but decreased its ability to inhibit DNMT1. The naphthyl derivatives **68** and **69** were found to strongly inhibit the DNMT3A and DNMT1, but **68** presented a problem of solubility in the DNMT3A assay conditions leading to a decrease of inhibition activity at 32 μ M. Derivative **69** was the most potent inhibitor with a submicromolar activity against DNMT3A (EC_{50} =0.33 μ M) and DNMT1 (EC_{50} =20 μ M).

Table 3. EC_{50} inhibition values against full length human DNMT1 and catalytic DNMT3A. EC_{50} are reported as the median concentration at which a compound inhibits 50% of the methylation efficacy and the standard error of at least 2 experiments ($EC_{50} \pm SE$ μ M).

Cpds	DNMT3A	DNMT1
SGI-1027	0.7 \pm 0.4	12 \pm 2
4	4.4 \pm 0.3	46 \pm 2
40	2.1 \pm 1.1	24 \pm 2
47	1.4 \pm 1.1	30 \pm 0
53	4.9 \pm 1.2	32 \pm 1
55	6.8 \pm 2.8	73 \pm 2
60	4.7 \pm 0.1	ND
61	1.1 \pm 1.1	26 \pm 1
62	7.7 \pm 1.3	27 \pm 3
67	1.1 \pm 1.2	100 \pm 3
68	1.9 \pm 1.2	16 \pm 2
69	0.3 \pm 0.2	20 \pm 4

ND= Not determined

Three inhibitors, parent compound **4**, active against both DNMT3A and DNMT1, selective inhibitor of DNMT3A compound **67** and the most potent DNMT inhibitor **69** were selected for further biological studies in cancer cell lines. In addition, the inactive compound **28** was used as negative control in the cellular experiments.

The antiproliferative activity of **4** on five cancer cell lines was measured (data in supplementary material). It showed a micromolar range cytotoxicity on all cell lines. (Table 4). Compounds **67** and **69** behave similarly in the leukemia KG-1 cell model.

To test the ability of the DNMT inhibitors to reactivate gene expression by demethylation of the promoter, we used a gene reporter model containing the luciferase under the control of a methylated promoter, CMV, in a stable construction in leukemia KG-1 cells, as previously described.^[10] (Table 4)

Compound **4** and **67** were able to induce by 4-fold the expression of the luciferase after 24h of treatment at 5 and 1 μ M, respectively. The negative compound **28** showed no induction of the luciferase expression. Compound **69** induced a 4-fold expression of the luciferase after 24h at 5 μ M. For comparison, non-nucleoside inhibitor SGI-1027 and nucleoside inhibitor 5azadC were used as control.

Next, we explored the methylation level of the CMV promoter upon treatment with compounds **4**, **67** and **69**, together with the nucleosome positioning. Indeed, the roles of DNA methylation and histones modifications in cancer initiation and progression are well established and emerging data have revealed that nucleosome remodelling works in concert with DNA methylation and histone modifications to play a central role in tumour-specific gene silencing.^[18] DNA methylation-induced silencing of tumour suppressor genes in cancer induces distinct changes in nucleosome positioning resulting in nucleosome occupancy at transcription start sites.^[19] The reactivation of silenced genes using DNMT inhibitors is accompanied with a loss of nucleosomes from the promoter region. Here, the impact of the treatment with the DNMT inhibitors at the CMV-promoter was analysed by using the NoMe-Seq method that allows to follow both DNA methylation and DNA accessibility.^[18a, 20]

After 24h of treatment with DNMTs inhibitors **4**, **67** and **69** a significant increase in the luciferase signal, of 4.7, 4.2 and 4.3-fold, respectively, was observed (table 4). 1 μ M of 5azadC was used as positive control. The concentrations were chosen in order to have no effect on cellular viability after 24h of treatment (data not shown). CMV methylation and nucleosome occupancy was studied on the same samples. CMV promoter was demethylated at 33%, 52% and 20% respectively, after treatment with compounds **4**, **67** and **69**. (Figure 3A) In addition, the **4**, **67** and **69** DNMTs inhibitors induced, when compared to not treated sample, an increase in DNA accessibility, chromatin opening of 77%, 87% and 82%, respectively (Figure 3B). For comparison, nucleoside inhibitor 5azadC demethylated by 50% the CMV promoter and increased the accessibility of the DNA by 120%.

Table 4. Cytotoxicity of compound **4**, **67** or **69** on cell line derived from leukemia, KG-1(the mean EC_{50} (μ M) \pm SE of two to three experiments is reported) and Reactivation fold of luciferase gene reporter in a CMV-Luc KG-1 construction. Luminescence was measured after 24h treatment of cells by 5-aza-2'-deoxycytidine, SGI1027, compounds **4**, **67** or **69**. Luciferase induction factor was represented as ratio of non-treated cells.

Cpds	Cytotoxicity on cell line derived from KG-1 (μ M)	Reactivation fold of luciferase gene reporter				
		Concentration (μ M)				
		10	5	3.2	1	0.1
5-Aza-2'-dC	0.2 \pm 0.04	14.8 \pm 2.9	15.1 \pm 3.0	17.3 \pm 1.2	16.2 \pm 3.1	9.2 \pm 2.5
SGI1027	4.8 \pm 1.1	7.5 \pm 3.9	17.5 \pm 5.0	6.7 \pm 1.6	1.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
4	0.5 \pm 0.1	2.5 \pm 1.1	4.7 \pm 1.3	2.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
67	0.4 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	4.2 \pm 0.1	5.0 \pm 0.6	4.1 \pm 0.3	2.7 \pm 0.1
69	1.3 \pm 0.9	2.2 \pm 0.8	4.3 \pm 0.7	1.4 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4	1.8 \pm 0.9
28	1.1 \pm 0.9	0.9 \pm 0.05	0.9 \pm 0.03	0.9 \pm 0.03	0.9 \pm 0.11	1.2 \pm 0.24



Experimental Section

Chemicals

SAM was bought from Sigma, aliquots in water were made and stored at -80°C . Commercial chemicals were from Sigma; oligonucleotides were bought from Eurogentec. The chemical synthesis and analysis of the conjugates are detailed in the Supplementary Information.

DNA methyltransferase activity

DNMT3A and DNMT1 assays were previously described.^[17] EC_{50} values were determined with curve fitting analysis method (non linear regression model with a sigmoid dose response, variable Hill slope coefficient) provided by the Prism Software (GraphPad). Results were expressed as average EC_{50} values (concentration of tested compound that inhibits 50% of the maximum effect for the considered compound).

Cell lines and reagents

WM266-4 human metastatic melanoma cells and PANC-1 human pancreatic carcinoma cells were obtained respectively from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, England) and from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultivated in DMEM media (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza), at 37°C and under 5% CO_2 . U-87 human primary glioblastoma cells and HCT116 human colon cancer cells were obtained from ATCC and cultivated in MEM containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and l-glutamine (Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum, at 37°C and under 5% CO_2 . U-87 human primary glioblastoma cells, KG-1 human acute myeloid leukemia cells and Karpas299 Non-Hodkin's Ki-positive Large Cells Lymphoma were obtained from the ATCC and cultivated in RPMI-1640 medium (Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum, at 37°C and under 5% CO_2 . 5-Aza-2'-deoxycytidine was obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and prepared as 10^{-2}M aliquots in H_2O . All compounds were prepared as 10^{-2}M aliquots in 100% DMSO. All aliquots were stored at -20°C and used as dilutions freshly prepared in culture medium.

Cell proliferation assay

For antiproliferative activity, cells were seeded (3.10^4 cells/mL for WM 266-4 and U-87, 2.10^4 cells/mL for PANC-1, KG-1 and Karpas 299 and $1.5.10^4$ cells/mL for HCT116) at day 0 in a 96-well plate. Cells were treated with test compound solutions at a dose range from $3.2.10^{-9}\text{M}$ to 1.10^{-5}M . Treatment was repeated on days 2 and 3, and on day 4 the antiproliferative activity of compounds was measured using the ATP quantification method "ATPlite one step Luminescence Assay System" (Perkin Elmer) according to the manufacturer conditions. Raw data were analysed with Prism 4.03 to generate EC_{50} values corresponding to the compound concentration required to cause a 50% decrease in cell viability as compared with untreated controls. The values presented are the mean of at least two independent experiments.

For other assays, cells were seeded at $2.10^5/\text{mL}$ for KG-1 and $1.10^5/\text{mL}$ for HCT116 at day 0 in 10mL in T25 flasks and cells were treated with different compounds of interest.

CMV-luc expression

KG-1-Luc cells, KG-1 cells stably transfected with the firefly luciferase (Luc+ from pGL3; Promega) reporter gene under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter (from pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc.) partially methylated (25 %), was seeded at 20000 cells per well in a 96-well plate. After 24 h incubation in the presence of the test compound or solvent (DMSO), the induction of the promoter was measured by quantification of luciferase with the Britelite™ assay system (PerkinElmer) according to the manufacturer's protocol. The luminescence was measured on an EnVision multilabel plate reader (PerkinElmer), and the data are

expressed as the fold induction as compared with the DMSO control. The mean of three experiments and the standard error is reported.

CMV nucleosome footprinting

Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing (NOME-Seq)

NOME-seq is a modified version of the methylation-dependent single promoter assay described by Miranda *et al.* 2010 and methylase-based DNA assay was performed as previously described with minor modifications.^[18a, 20] After nuclei extraction, GpC methyltransferase (M.CviPI; New England Biolabs) reactions were done in M.CviPI reaction buffer. GpC methyltransferase treatment was followed by DNA extraction, sodium bisulfite conversion, PCR amplification of the region of interest, cloning, and sequencing of individual clones to reveal the structure of single replicas as functional units. KG-1-Luc cells treated with different conditions were centrifuged for 5 min at $500 \times g$. Cell pellets were washed in ice-cold PBS, resuspended in 1 mL of ice-cold nuclei buffer [10mM Tris (pH 7.4), 10mM NaCl, 3mM MgCl_2 , 0.1mM EDTA, and 0.5% Nonidet P-40, plus protease inhibitors] per 2×10^6 cells, and incubated on ice for 10 min. Nuclei were recovered by centrifugation at $900 \times g$ for 5min, washed twice in nuclei wash buffer [10 mM Tris (pH 7.4), 10mM NaCl, 3mM MgCl_2 , and 0.1 mM EDTA containing protease inhibitors], and resuspended with 200 μL in $1 \times$ M.CviPI reaction buffer supplemented with 0.3M sucrose, 160 μM (New England Biolabs) S-Adenosyl-L-methionine (SAM). 100 μL of purified genomic DNA were treated with 100 U of M.CviPI for 15 min at 37°C in 200 μL final volume. The other part of 100 μL of purified genomic DNA were not treated with 100 U of M.CviPI but just incubated for 15min at 37°C to obtain CpG methylation profile on the sequence of interest. Previous publications using locus-specific NOME-seq have used the minimal amount of M.CviPI that resulted in optimal footprinting of the specific region of interest: 100 units,^[21] 200 units,^[20b, 22] or 200 + 100 units.^[23] Reactions were stopped by the addition of an equal volume of stop solution [20mM Tris-HCl (pH 7.9), 600mM NaCl, 1% SDS, 10mM EDTA, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K] and incubated at 55°C overnight. DNA was purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Bisulfite conversion was performed with the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research). Bisulfited DNA was eluted with 12 μL of water and 8 μL were used for CMV amplification.

PCR amplification of bisulfite-treated DNA

The CMV promoter DNA amplification was set up with 8.3 μL eluted bisulfited DNA in 20 μL PCR reaction containing $1 \times$ KAPA2G Buffer A, 2mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 125nM each primer and 1unit KAPA2G™ Robust HotStart DNA Polymerase (KapaBiosystems) on C1000 Touch™ thermal cycler 95°C 3min following by 95°C for 20 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec \times 40 cycles and final extension at 72°C 1 min. PCR fragments were quality controlled by agarose gel electrophoresis. Primers used were: forward, 5'- GGGGTTATTAGTTTATAGTTTATATATGGA-3'; reverse, 5'- AATACCAAAACAACTCCCATTAAAC.

Steps of cloning and sequencing were as the same were described previously except M13 PCR which was performed to amplify cloned sequence in a 20 μL PCR reaction containing $1 \times$ KAPA2G Buffer B, 2mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 125nM each primer and 1unit KAPA2G™ Robust HotStart DNA Polymerase (KapaBiosystems) on C1000 Touch™ thermal cycler 95°C 3min following by 95°C for 20 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec \times 40 cycles and final extension at 72°C 1 min.

Sequence alignment and analysis of CG and GC methylation levels

Genomic alignment and bisulfite sequence analysis was performed largely as previously described.^[24]

BISMA (Bisulfite Sequencing DNA Methylation Analysis) software was used for CpG methylation analysis of primary bisulfite sequencing data from subcloned individual.^[25] Typically in such a lollipop-style map, red (CG) symbols are indicative of a methylated cytosine while blue (CG) symbols represent unmethylated cytosines. Methyl Viewer was used with parameters to obtain GC methylation results and nucleosome occupancy.^[26] With this software results

black (GC) symbols represented of a methylated cytosine and white (GC) symbols represent unmethylated cytosines. The ratio of methylation is representative to the chromatin accessibility by M.CviPI and nucleosome occupancy.

The combined methylation status for each clone by CG (BISMA) or GC (Methyl Viewer) site has been assembled and represented as shown in figure 3, where each row corresponds to one of the individual cloned alleles, and each column represents an individual CG or GC site.

The methylation status of CG and GC cytosines at a given position within the sequence, given as ratio of methylation, can be calculated as follows: $R = [MCT/MCNT]$, where MCT is the percentage of Methylated Cytosines into analysed DNA sequence in Treated sample, and MCNT is the percentage of Methylated Cytosines into the same analysed DNA sequence in Not Treated sample. Accuracy is improved by increasing the number of clones analyzed, provided there is not bias in the cloning or amplification steps.

Methylation analysis

DNA extraction and bisulfite treatment

DNA was isolated from cultured cells using the DNeasy Blood and Tissue Kit according to the manufacturer's specifications (Qiagen). DNA bisulphite conversion was performed on 2 µg of DNA using the EZ DNA Methylation-Gold Kit according to the manufacturer's specifications (Zymo Research) and bisulfited DNA was eluted with 10 µL of water.

Bisulfite-specific primers with a minimum length of 18bp were designed using Primer 3 program.^[27] The target sequence of the designed primers contained no CpGs allowing amplification of both un- and hypermethylated DNAs. All primers were tested for their ability to yield high quality sequences and primers that gave rise to an amplicon of the expected size using non-bisulfite treated DNA as a template were discarded, thus ensuring the specificity for bisulfite-converted DNAs.

Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

This technique combine bisulfite conversion based polymerase chain reaction with restriction digestion. DNA methylation levels are easily and quickly measured.

CDKN2A promoter PCR amplification of bisulfite-treated DNA

DNA amplification was set up with 100 ng eluted bisulfited DNA in 50 µL PCR reaction containing 1× PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.3mM dNTPs, 400nM each primer and 1.25 units EpiTaq HS (Takara) on C1000 Touch™ thermal cycler by 98°C for 10 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec × 40 cycles. Primers used in this study were: forward, 5'- GGTTT TTTTAGAGGATTTGAGGGATAGG-3'; reverse, 5'- CTACCTAATTCCAATTCCTACAACTTC. 20 µL of PCR amplicons were digested in 30 µL by 2 units of BsiEI at 60°C for 90 min. DNA fragments were migrated by 2% agarose gel electrophoresis and each band was quantified by Image Lab Software v2.0 (BioRad Laboratories).

Acknowledgments

This work was supported to P.B.A. by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Région Midi Pyrénées [Equipe d'Excellence and FEDER CNRS/Région Midi Pyrénées]; and Fondation InNaBioSanté.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: gene reexpression · DNA methylation · inhibitors · bisubstrat conjugates · quinazoline derivatives

[1] aS. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhatar, A. Shilatfard, *Genes Dev* **2009**, *23*, 781-783; bT. K.

Kelly, D. D. De Carvalho, P. A. Jones, *Nat Biotechnol* **2010**, *28*, 1069-1078.

[2] C. Gros, J. Fahy, L. Halby, I. Dufau, A. Erdmann, J. M. Gregoire, F. Ausseil, S. Vispe, P. B. Arimondo, *Biochimie* **2012**, *94*, 2280-2296.

[3] aP. A. Jones, *Nat Rev Genet* **2012**, *13*, 484-492; bS. B. Baylin, P. A. Jones, *Nature reviews. Cancer* **2011**, *11*, 726-734; cK. Pandiyan, J. S. You, X. Yang, C. Dai, X. J. Zhou, S. B. Baylin, P. A. Jones, G. Liang, *Nucleic acids research* **2013**, *41*, 3973-3985.

[4] R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2011**, *12*, 206-222.

[5] D. Subramaniam, R. Thombre, A. Dhar, S. Anant, *Frontiers in oncology* **2014**, *4*, 80.

[6] aA. Erdmann, L. Halby, J. Fahy, P. B. Arimondo, *Journal of medicinal chemistry* **2015**, *58*, 2569-2583; bK. Lund, J. J. Cole, N. D. VanderKraats, T. McBryan, N. A. Pchelintsev, W. Clark, M. Copland, J. R. Edwards, P. D. Adams, *Genome Biol* **2014**, *15*, 406.

[7] L. F. Hennequin, A. P. Thomas, C. Johnstone, E. S. Stokes, P. A. Ple, J. J. Lohmann, D. J. Ogilvie, M. Dukes, S. R. Wedge, J. O. Curwen, J. Kendrew, C. Lambert-van der Bempt, *Journal of medicinal chemistry* **1999**, *42*, 5369-5389.

[8] aL. Isakovic, O. M. Saavedra, D. B. Llewellyn, S. Claridge, L. Zhan, N. Bernstein, A. Vaisburg, N. Elowe, A. J. Petschner, J. Rahil, N. Beaulieu, F. Gauthier, A. R. MacLeod, D. Delorme, J. M. Besterman, A. Wahhab, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 2742-2746; bO. M. Saavedra, L. Isakovic, D. B. Llewellyn, L. Zhan, N. Bernstein, S. Claridge, F. Raepel, A. Vaisburg, N. Elowe, A. J. Petschner, J. Rahil, N. Beaulieu, A. R. MacLeod, D. Delorme, J. M. Besterman, A. Wahhab, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 2747-2751.

[9] J. Datta, K. Ghoshal, W. A. Denny, S. A. Gamage, D. G. Brooke, P. Phiasivongsa, S. Redkar, S. T. Jacob, *Cancer research* **2009**, *69*, 4277-4285.

[10] E. Rilova, A. Erdmann, C. Gros, V. Masson, Y. Aussagues, V. Poughon-Cassaboiss, A. Rajavelu, A. Jeltsch, Y. Menon, N. Novosad, J. M. Gregoire, S. Vispe, P. Schambel, F. Ausseil, F. Sautel, P. B. Arimondo, F. Cantagrel, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 590-601.

[11] J. Yoo, S. Choi, J. L. Medina-Franco, *PLoS One* **2013**, *8*, e62152.

[12] A. Mann, W. Camille Georges, in *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*, Academic Press, New York, **2008**, pp. 363-379.

[13] S. Castellano, D. Kuck, M. Sala, E. Novellino, F. Lyko, G. Sbardella, *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*, 2321-2325.

[14] S. Asgatay, C. Champion, G. Marloie, T. Drujon, C. Senamaud-Beaufort, A. Ceccaldi, A. Erdmann, A. Rajavelu, P. Schambel, A. Jeltsch, O. Lequin, P. Karoyan, P. B. Arimondo, D. Guianvarc'h, *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57*, 421-434.

[15] A. A. Mortlock, K. M. Foote, N. M. Heron, F. H. Jung, G. Pasquet, J. J. Lohmann, N. Warin, F. Renaud, C. De Savi, N. J. Roberts, T. Johnson, C. B.

- Dousson, G. B. Hill, D. Perkins, G. Hatter, R. W. Wilkinson, S. R. Wedge, S. P. Heaton, R. Odedra, N. J. Keen, C. Crafter, E. Brown, K. Thompson, S. Brightwell, L. Khatri, M. C. Brady, S. Kearney, D. McKillop, S. Rhead, T. Parry, S. Green, *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50*, 2213-2224.
- [16] S. L. Buchini, C.J., *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *14*, 3152-3168.
- [17] aR. Z. Jurkowska, A. Ceccaldi, Y. Zhang, P. B. Arimondo, A. Jeltsch, *Methods Mol Biol* **2011**, *791*, 157-177; bC. Gros, L. Chauvigne, A. Poulet, Y. Menon, F. Ausseil, I. Dufau, P. B. Arimondo, *Nucleic Acids Res* **2013**.
- [18] aS. Sharma, T. K. Kelly, P. A. Jones, *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27-36; bN. Ahuja, H. Easwaran, S. B. Baylin, *The Journal of clinical investigation* **2014**, *124*, 56-63.
- [19] J. C. Lin, S. Jeong, G. Liang, D. Takai, M. Fatemi, Y. C. Tsai, G. Egger, E. N. Gal-Yam, P. A. Jones, *Cancer cell* **2007**, *12*, 432-444.
- [20] aK. Hochedlinger, K. Plath, *Development* **2009**, *136*, 509-523; bJ. S. You, T. K. Kelly, D. D. De Carvalho, P. C. Taberlay, G. Liang, P. A. Jones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 14497-14502; cT. K. Kelly, Y. Liu, F. D. Lay, G. Liang, B. P. Berman, P. A. Jones, *Genome Res* **2012**, *22*, 2497-2506.
- [21] E. M. Wolff, H. M. Byun, H. F. Han, S. Sharma, P. W. Nichols, K. D. Siegmund, A. S. Yang, P. A. Jones, G. Liang, *PLoS Genet* **2010**, *6*, e1000917.
- [22] P. C. Taberlay, T. K. Kelly, C. C. Liu, J. S. You, D. D. De Carvalho, T. B. Miranda, X. J. Zhou, G. Liang, P. A. Jones, *Cell* **2011**, *147*, 1283-1294.
- [23] C. Andreu-Vieyra, J. Lai, B. P. Berman, B. Frenkel, L. Jia, P. A. Jones, G. A. Coetzee, *Mol Cell Biol* **2011**, *31*, 4648-4662.
- [24] B. P. Berman, D. J. Weisenberger, J. F. Aman, T. Hinoue, Z. Ramjan, Y. Liu, H. Noushmehr, C. P. Lange, C. M. van Dijk, R. A. Tollenaar, D. Van Den Berg, P. W. Laird, *Nat Genet* **2012**, *44*, 40-46.
- [25] C. Rohde, Y. Zhang, R. Reinhardt, A. Jeltsch, *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 230.
- [26] C. E. Pardo, I. M. Carr, C. J. Hoffman, R. P. Darst, A. F. Markham, D. T. Bonthron, M. P. Kladde, *Nucleic acids research* **2011**, *39*, e5.
- [27] aT. Koressaar, M. Remm, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1289-1291; bA. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, S. G. Rozen, *Nucleic acids research* **2012**, *40*, e115.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chapitre 6 – Conclusions et perspectives

Depuis deux décennies, les données scientifiques dans le domaine de l'épigénétique et l'intérêt pour cette discipline sont en pleine expansion [Figure 34]. En effet, cette discipline couplée aux progrès technologiques, apporte aujourd'hui, la possibilité de décrypter le fonctionnement du génome en tenant compte de l'influence de l'environnement.

Comme nous l'avons vu, l'épigénétique se définit comme l'étude de l'ensemble des marques apposées sur le génome, orchestrant une organisation du patrimoine génétique en domaines actifs et non actifs, permettant ainsi une sélection et une lecture dirigée de l'information génétique. Ces marques ont comme propriété d'être à la fois stables et héréditaires au cours des divisions cellulaires, mais aussi modifiables et/ou réversibles en fonction de l'environnement et ainsi d'avoir des conséquences, à plus ou moins long terme. C'est à ce caractère réversible que nous nous sommes intéressés.

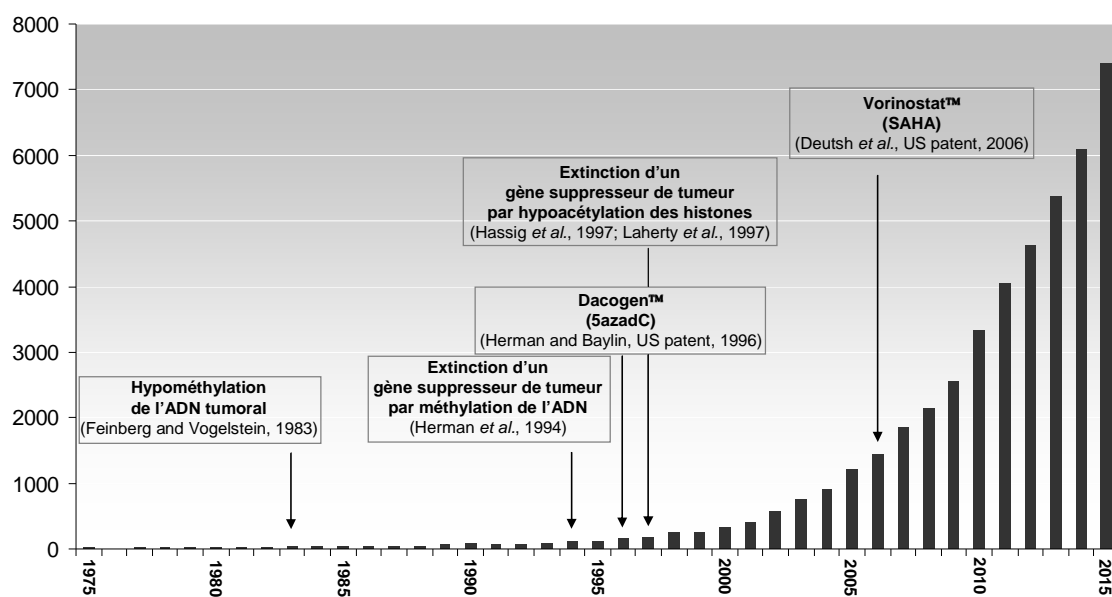


Figure 34. Utilisation du terme "épigénétique" dans les titres des publications scientifiques.

Représentation graphique de la fréquence d'utilisation du terme "épigénétique" au cours des 40 dernières années. Source Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

L'objectif principal de cette thèse était de mettre en évidence au niveau cellulaire, l'activité déméthylante de nouveaux inhibiteurs non-nucléosidiques que nous développons au laboratoire, associée à une ré-expression des gènes. Ce travail consistait

également à caractériser le mode d'action de ces nouveaux inhibiteurs de la méthylation de l'ADN.

Pour cela, nous avons utilisé une méthodologie basée sur des tests enzymatiques, déjà en place au laboratoire, qui nous permettent de mesurer l'activité de nos molécules. Mon travail a consisté, dans un premier temps, à valider dans un environnement cellulaire ces activités mesurées *in-vitro*. Cela a été entrepris à la fois dans des lignées de cancers hématopoiétiques mais aussi dans une lignée de cancer colorectal. Nous avons fait le choix d'utiliser cette dernière lignée car elle est abondamment décrite (Sandoval *et al.*, 2011), mais aussi pour sa sensibilité de réponse à l'inhibition des DNMTs (Baylin and Ohm, 2006 ; Link *et al.*, 2013 ; Ahmed *et al.*, 2013 ; Subramaniam *et al.*, 2014 ; Gaddis *et al.*, 2015 ; Lay *et al.*, 2015).

Nous avons en particulier analysé les effets de ces molécules dans le temps, jusqu'à plusieurs semaines de traitement. En effet, un phénomène de mémoire a été décrit comme étant caractéristique d'une reprogrammation épigénétique des cellules cancéreuses, et expliquerait l'effet retardé observé chez les patients (Oki *et al.*, 2008)

Nous nous sommes ainsi intéressés à plusieurs séries chimiques de petites molécules (Rilova *et al.*, 2014 ; Erdmann *et al.*, 2015a ; Erdmann *et al.*, 2015b, Annexes 2, 3 et 4), qui ne sont pas des analogues de nucléoside. Parmi les composés étudiés, une activité déméthylante au niveau cellulaire a été mise en évidence pour deux séries chimiques.

La **première série de flavonoides** identifiée lors d'un criblage enzymatique du complexe Dnmt3A/3L (Ceccaldi *et al.*, 2011), a fait l'objet d'optimisations chimiques qui ont permis une stabilisation, dans les tampons biologiques, d'une 3-chloro-3-nitroflavanone, que nous avons appelé composé **3**. Ces améliorations ont été essentielles dans la révélation de l'activité cellulaire de cette série chimique (Menon *et al.*, soumis pour publication). Nous avons alors entrepris de caractériser le profil épigénétique de ce composé et de le comparer à la 5azadC, le composé de référence utilisé en clinique.

Les résultats que nous avons obtenu montrent que ce composé **3** est **capable de déméthylé des promoteurs de gènes** tels que *HOXA7* et *SERPINB1* dans les cellules de

cancer prostatique LNCaP, mais également *CDKN2B* dans les lignées de cancer hématopoïétiques KG1 et Karpas 299, et *CDKN2A* dans la lignée de cancer colorectal HCT116. Dans cette dernière lignée nous avons également montré que **cette déméthylation pouvait s'accompagner de la ré-expression du gène** : faiblement après 3 jours de traitements et une déméthylation de 20%, puis plus fortement après 7 jours de traitements où la déméthylation est aussi plus marquée (près de 50%). Cependant lorsque l'on poursuit le traitement jusqu'à 3 semaines, la déméthylation diminue et le gène n'est plus ré-exprimé. Dans les mêmes conditions, la 5azadC entraîne une déméthylation deux fois plus importante, mais étonnamment la ré-expression de *CDKN2A* n'est également observée qu'après 7 jours de traitements et **perdue après 3 semaines**. Ces résultats se rapprochent néanmoins des résultats présentés par Suzuki *et al.*, en 2004 et Tsai *et al.*, en 2012.

Les techniques que nous avons utilisées au laboratoire (BCS, MSP, COBRA) sont longues et ne permettent d'analyser la méthylation que d'un seul promoteur à la fois. C'est pourquoi, une analyse du **méthylome** a également été réalisée sur ces échantillons de cellules HCT116 traitées avec le composé **3** pendant 3, 7 et 21 jours. **Une centaine de gènes potentiellement déméthylés** a ainsi pu être identifiée.

Une analyse de ces gènes à l'aide de l'outil *Ingenuity Pathway Analysis*[®] nous a permis de regrouper certains d'entre eux dans des fonctions biologiques critiques telles que le développement, la régulation du **cycle cellulaire** et de la **prolifération**, ou encore la **mort cellulaire**. Les résultats que nous avons obtenus montrent que **la déméthylation des gènes qui constituent certaines de ces fonctions est maintenue jusqu'au jour 21**. C'est le cas notamment pour des gènes associés au cycle cellulaire et à la prolifération qui sont déméthylés dès 3 jours de traitement et aussi après 7 jours et 21 jours. La déméthylation de gènes associés à la mort cellulaire est observée seulement après 7 jours et maintenue jusqu'au jour 21. Certains de ces gènes déméthylés par les traitements avec le composé **3** sont des **gènes suppresseurs de tumeurs** tels que *APC2*, *LET-7*, *BST1* (alias *CD38*) ou *CCNY* (alias *CDK16*). D'autres gènes sont impliqués dans le **remodelage de la chromatine** ou la **stabilité du génome** comme *FOXO1*, *PRDMs* et *TELO2*. En outre, certains gènes sont impliqués dans la **différenciation** comme les gènes de la famille *SOX*. Potentiellement certains de ces gènes peuvent être ré-exprimés en réponse au traitement et participer à la mort des cellules cancéreuses ou à leur

différenciation. A ce stade de nos investigations il serait intéressant d'analyser la ré-expression de ces gènes ou de réaliser une analyse de transcriptomique par exemple, ce qui permettrait d'étudier les conséquences de ces ré-expressions sur un phénotype cancéreux.

Par ailleurs, l'analyse des données de méthylome, obtenues suite aux traitements avec le composé **3**, montrent une **répartition des CpGs déméthylés, principalement dans les îlots CpG** et en particulier dans les **régions TSS1500 et 5'UTR** des gènes. Ce résultat est différent de celui obtenu après un traitement par la **5AzadC**, qui **entraîne une déméthylation** principalement observée **dans le corps des gènes** (Yang *et al.*, 2014). De plus, contrairement à la 5azadC, le composé **3** n'entraîne pas de déméthylation des séquences répétées de type LINE-1 (données non présentées). Ce résultat est très encourageant car nous décrivons pour la première fois des **effets à long terme** et la **spécificité de cibles potentielles de cette classe d'inhibiteurs de DNMT non nucléosidiques**, par rapport à la 5azadC et à son mode d'action lié à son intégration dans l'ADN. Des travaux d'optimisation chimique de ces molécules sont toujours en cours dans le but d'augmenter, encore plus, les propriétés de stabilité dans les milieux de culture et continuer à améliorer leurs effets cellulaires.

Nous nous sommes également intéressés à une **deuxième famille de molécules de type bi-substrats** (Halby *et al.*, en préparation) pour laquelle une SAR détaillée a été réalisée. Nous nous sommes aidés pour cela des activités obtenues *in-vitro*. Les résultats obtenus dans notre équipe montrent que ce type de molécules, constituées d'un noyau cytosine d'une part et d'un analogue d'adénine d'autre part, est capable d'inhiber les DNMTs. Certains composés présentent, en outre, une inhibition **spécifique de DNMT3A**. Parmi tous les composés synthétisés par le Dr. Ludovic Halby, l'activité des composés **4**, **67** et **69** a été évaluée au niveau cellulaire. Comme avec les flavanones, ces composés de type bi-substrat présentent une **activité déméthylante moins importante que celle obtenue en réponse à des traitements avec la 5azadC**. Ceci est lié au fait que ces molécules agissent par déméthylation passive en inhibant le maintien de la méthylation de l'ADN lors de la réplication de l'ADN (Erdmann *et al.*, 2015c). La déméthylation observée avec ces inhibiteurs sera donc dépendante de leur efficacité au moment de chaque réplication et peut ainsi se traduire sous la forme d'une équation comme cela est représenté à la [Figure 35]. La 5azadC, au contraire, induit une

déméthylation active en formant un complexe covalent irréversible avec les DNMTs qui sont alors dégradées par le protéasome, tandis que l'ADN est réparé.

Dans le cas des bi-substrats, nous avons également analysé la méthylation de *CDKN2A* dans la lignée HCT1116, et les résultats obtenus montrent, comme pour le composé 3-chloro-3-nitroflavanone, une **déméthylation plus importante après 7 jours de traitement**. Ces trois composés, bi-substrat, ont aussi été évalués à l'aide du **modèle cellulaire KG1-Luc** avec lequel nous avons pu observer une **déméthylation du promoteur CMV**.

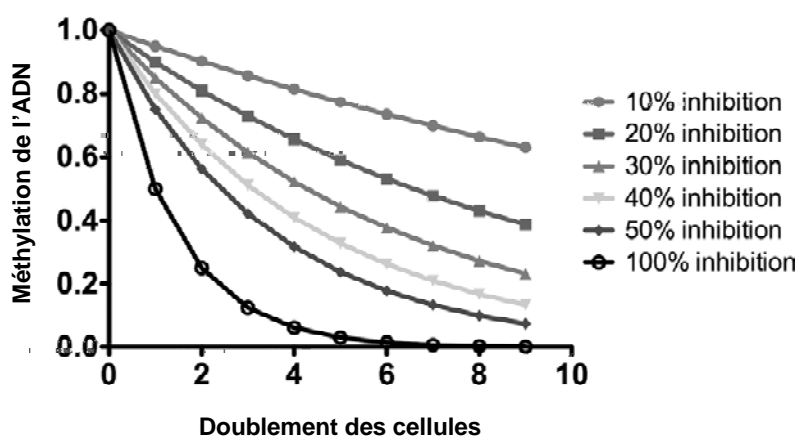


Figure 35. Déméthylation passive de l'ADN.

La perte passive de la méthylation de l'ADN dans les cellules est fonction de l'efficacité des inhibiteurs catalytiques. Les courbes ont été obtenues en utilisant l'équation suivante: méthylation de l'ADN = $[(1 - x) / 2]^n$, où 1 représente une méthylation maximale de l'ADN, x est l'efficacité d'inhibition ($0 \leq x \leq 1$), et n le temps de doublement.

Nous avons par ailleurs utilisé le modèle cellulaire KG1-Luc, pour analyser l'**effet de nos composés sur la chromatine**. En effet, le **deuxième objectif de cette thèse** était de caractériser plus en détail l'effet de ces inhibiteurs de la méthylation, sur d'autres paramètres épigénétiques liés à cette déméthylation, en particulier leur impact au niveau de la chromatine.

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de nos composés, les plus actifs *in-vitro*, sur leur capacité à induire une **expression de la luciférase**. Lorsque cette réponse était positive, nous avons alors analysé la **déméthylation du promoteur CMV** et l'**ouverture de la chromatine** sur cette séquence promotrice.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une déméthylation du promoteur CMV par le composé **3** de la famille des **flavanones** et une ouverture de la chromatine relativement

importante. Afin de minimiser les biais connus de ce modèle, nous avons comparé l'effet obtenu avec cet inhibiteur non nucléosidique, à l'effet de la 5azadC mais aussi au composé **4**, un composé négatif de la série flavanone. Ce composé ne présentant aucune activité d'inhibition des DNMT *in-vitro*.

Ces analyses ont également été réalisées avec les composés **4**, **67** et **69** de la série **bi-substrat**. Une déméthylation du promoteur CMV est bien observée avec ces molécules mais l'ouverture de la chromatine, bien que présente, montre un **effet moins marqué** pour cette série chimique.

Enfin, lors des criblages réalisés par notre équipe, ce modèle était utilisé seulement avec un traitement des cellules durant 24h. Les résultats obtenus au cours de cette thèse, ont également permis de mettre en évidence un **effet déméthylant** de ces molécules sur la séquence promotrice CMV, ainsi que l'**ouverture de la chromatine** après **3 jours de traitement**. Ceci est important puisqu'il s'agit d'une **caractéristique des phénomènes épigénétiques**.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé ce modèle CMV-Luc pour analyser les **modifications des histones** ainsi que **le recrutement des facteurs de transcription** après 3 jours de traitement. Ce travail a été réalisé uniquement pour le **composé 3**, et nous avons comparé les résultats obtenus pour ce produit avec les effets observés avec la **5azadC** dans les mêmes conditions.

Nos résultats montrent un **profil similaire** entre ce composé non nucléosidique et celui obtenu avec la 5azadC. En effet, nous observons avec ces deux molécules une **diminution de la marque d'histone inhibitrice H3K9**, au niveau de la séquence promotrice CMV, et un **recrutement du facteur de transcription CREB**. Cet effet est néanmoins moins marqué avec notre composé.

Au cours de cette thèse nous avons donc pu mettre en évidence l'activité déméthylante de petites molécules chimiques qui ne sont pas des analogues de nucléosides. Nos résultats montrent également des effets similaires au niveau de la chromatine entre nos molécules inhibitrices de DNMT et la 5azadC. Nous avons par ailleurs mis en évidence avec le **composé 3** une **déméthylation plus spécifique** des îlots CpG localisés au niveau **des régions promotrices des gènes**. Ceci n'est pas le cas avec la **5azadC**, pour laquelle les régions déméthylées sont beaucoup plus réparties

dans **tout le génome** mais aussi dans les corps des gènes. Il a été décrit que la 5azadC **s'intègre dans l'ADN**, tout le long du génome, au moment de la réplication et entraîne ainsi une **déméthylation non ciblée des CpG**. D'autres travaux ont montré par ailleurs, que cette molécule possède de nombreux effets non spécifiques tels que des **dommages à l'ADN** (Biswal *et al.*, 2012) ou une **inhibition de la synthèse protéique** (Aimiwu *et al.*, 2012). Ces actions non épigénétiques **pourraient expliquer** en partie les **effets plus importants** et les **cinétiques plus courtes** observées avec la 5azadC.

Nos **inhibiteurs non nucléosidiques** agissent plutôt de manière **catalytique** au niveau des DNMT et inhiberaient donc la méthylation de **régions régulatrices, ciblées plus spécifiquement par les DNMT**.

Nos molécules présentent cependant des activités moins importantes que la 5azadC et elles **restent encore à améliorer**, en particulier au niveau de leur **stabilité** pour la série flavanone et au niveau de la **solubilité** en ce qui concerne les bi-substrats.

La recherche et la caractérisation d'inhibiteurs non-nucléosidiques des DNMT sont des défis pouvant amener vers de nouveaux candidats médicaments, mais qui se heurtent à de nombreux problèmes. En effet, la méconnaissance des mécanismes mis en jeu, lors d'une inhibition catalytique des DNMT, est un problème inhérent à la recherche d'agents déméthylants non-nucléosidiques.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons utilisé notre modèle cellulaire KG1 **CMV-Luc** comme **un modèle prédictif**, permettant de classer ces nouveaux composés en fonction de leur **capacité à démétyler l'ADN et à induire une ré-expression génique**. De plus, la compréhension du rôle des CpG au niveau des promoteurs peut aider dans la conception d'outils spécifiques de ces régions et cela peut également permettre d'identifier si certains CpG jouent un rôle majeur dans ces séquences promotrices.

Pour cela, nous nous sommes intéressés aux données de méthylation du **promoteur CMV**, que nous avons analysées **CpG par CpG**. Ceci nous a permis d'isoler les CpG localisés sur les séquences correspondantes aux sites potentiels de fixation des **facteurs de transcription** SP1, CREB et NFkB. Nous avons ensuite comparé la méthylation de ces CpG spécifiques et la méthylation des autres CpG présents sur la séquence du promoteur CMV, mais localisés en dehors des sites de fixation des facteurs de transcription. Dans cette analyse nous avons rapporté les valeurs de méthylation obtenues pour chaque

composé chimique en fonction des valeurs d'expression de la luciférase [Figure 36]. Les données disponibles pour une troisième série de molécules ont été utilisées pour réaliser ces analyses. A ce jour, cette série chimique fait l'objet d'une demande de brevets par notre équipe et les structures des trois composés représentés sur les graphiques ne peuvent pas être communiquées.

Les résultats ainsi obtenus permettent d'établir l'existence d'une **corrélation entre le niveau de méthylation du promoteur CMV et le niveau d'expression de la luciférase**. De plus, lorsque cette même analyse est réalisée uniquement avec les **CpG correspondants aux sites de fixation des facteurs** de transcription, nous constatons une **meilleure corrélation** entre ces deux paramètres. Cela montre l'importance de certains CpG au sein d'un même promoteur. Ces CpG semblent ainsi jouer un **rôle majeur dans la régulation de la transcription** et l'analyse spécifique de leur méthylation peut donc être un **bon marqueur** de l'effet d'inhibiteurs épigénétiques. Ce résultat est, par ailleurs, renforcé par les résultats de ChIP pour lesquels nous observons un recrutement du facteur de transcription CREB.

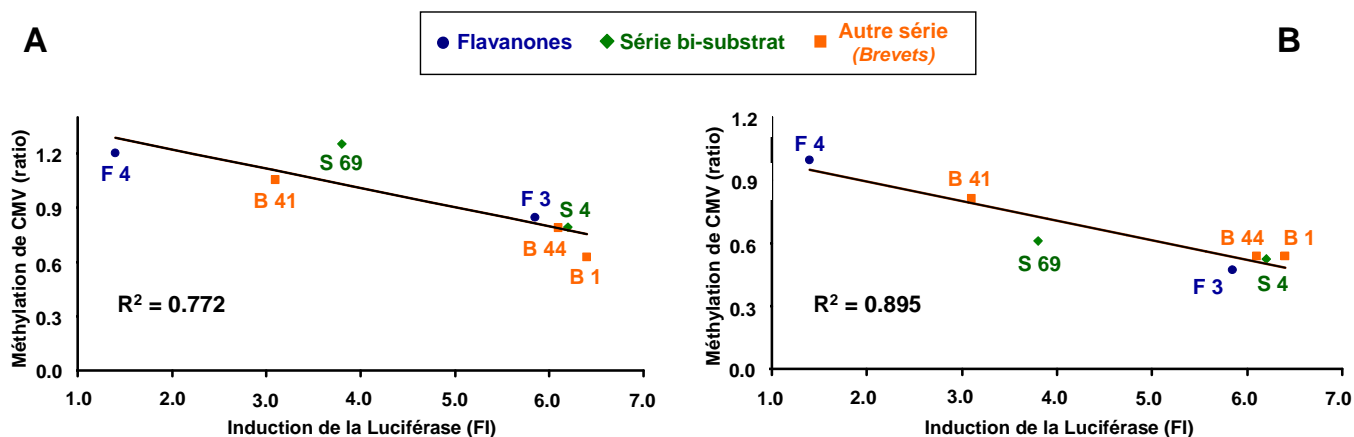


Figure 36. Déméthylation du promoteur CMV et expression de la luciférase.

Représentation graphique des valeurs de méthylation en fonction de l'induction de la luciférase. Ces résultats sont obtenus pour plusieurs composés non nucléosidiques, appartenant à 3 séries chimiques différentes. Les résultats sont représentés pour tous les CpG présents sur la séquence promotrice (A), et uniquement pour les CpG localisés sur les séquences potentielles de fixation des facteurs de transcription (B).

Nous avons utilisé la même approche concernant l'état d'accessibilité de la chromatine [Figure 37]. Le résultat que nous avons obtenu montre également une corrélation entre le niveau d'ouverture de la chromatine et le niveau d'expression de la luciférase.

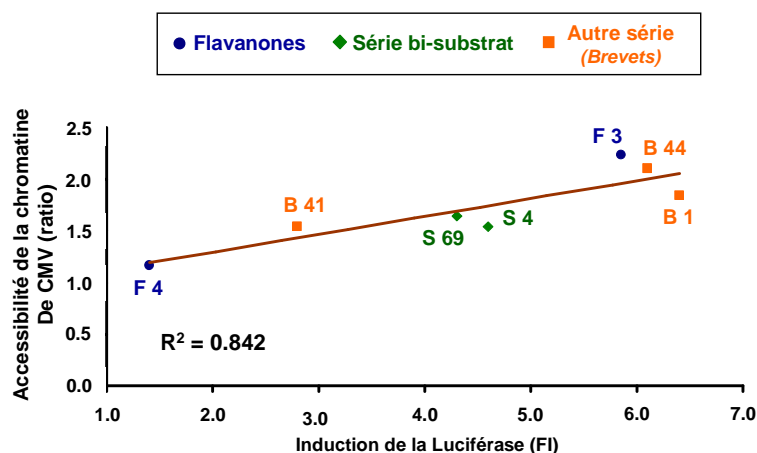


Figure 37. Ouverture de la chromatine de CMV et expression de la luciférase.

Représentation graphique des valeurs d'ouverture de la chromatine en fonction de l'induction de la luciférase. Ces résultats ont été obtenus pour plusieurs composés non nucléosidiques correspondants à 3 séries chimiques différentes.

Ces analyses ont été réalisées à très petite échelle mais il est intéressant de noter que Whitaker *et al.*, ont développé en 2015 un outils bio-informatique, nommé Epigram (<http://wanglab.ucsd.edu/star/epigram>), basé sur l'analyse des modifications épigénétiques. Cet outil d'analyse in-silico se base essentiellement sur les séquences correspondant aux sites de fixation des facteurs de transcription, pour analyser des modifications de l'épigénome.

Par ailleurs, des expériences préliminaires avec ce modèle KG1 CMV-Luc ont permis de mettre en évidence des effets synergiques sur l'expression de la luciférase, lorsque les cellules sont traitées avec certaines combinaisons d'inhibiteurs épigénétiques. Ces premières expériences montrent également que cette approche pourrait permettre de réduire les concentrations requises des composés utilisés dans les traitements de chimiothérapie, limitant de cette manière les effets secondaires.

Ce modèle cellulaire pourrait donc être utilisé afin d'évaluer le potentiel de ces nouveaux inhibiteurs de DNMT, en combinaison avec des inhibiteurs de désacétylases des histones (HDACi) ou d'autres acteurs épigénétiques. En effet, lorsqu'ils sont utilisés seuls, les modulateurs de marques d'histones ne réussissent pas à induire une ré-expression stable des gènes dont le promoteur est hyperméthylé (Miranda *et al.*, 2009). D'un autre côté, le traitement uniquement par un agent déméthylant d'ADN induit une déméthylation des promoteurs de TSG qui n'est pas forcément corrélée à une ré-

expression, probablement à cause des marques d'histones (Flotho *et al.*, 2009). Ainsi, une forte synergie a été observée suite à des traitements combinés de modulateurs de marques d'histones et des agents déméthylants de l'ADN (Cameron *et al.*, 1999 ; Fandy *et al.*, 2009 ;). Une étude clinique a démontré l'efficacité d'une combinaison de 5-azacytidine et de phénylbutyrate dans le cadre de tumeurs solides et de leucémies (Rudek *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'utilisation, en culture cellulaire, d'une combinaison de de décitabine avec du belinosat ou du panobinostat révèle également un effet antileucémique (Kalak *et al.*, 2015 ; Marchi *et al.*, 2015).

Les inhibiteurs d'HDACs et de la méthylation de l'ADN peuvent également être associés à des composés classiquement utilisés lors de chimiothérapies. L'avantage de cette approche est tout d'abord de se baser sur un traitement existant partiellement efficace. Il a ainsi été montré que l'utilisation du phénylbutyrate et de la 5azadC sensibilise des cellules B tumorales à l'action de la doxorubicine, (Witzig *et al.*, 2000 ; Clozel *et al.*, 2013).

Des études de plus en plus nombreuses s'intéressent aussi à l'utilisation de ces thérapies épigénétiques en combinaison avec des traitements basés sur l'utilisation d'anticorps thérapeutiques (Yang *et al.*, 2014 ; Ørskov *et al.*, 2015). Des études récentes révèlent aussi que le mécanisme d'action des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN passerait par une activation du système immunitaire (Li *et al.*, 2014; Chiappinelli *et al.*, 2015; Roulois *et al.*, 2015). Il sera ainsi intéressant de tester nos inhibiteurs les plus prometteurs en suivant cette dernière approche mais aussi dans des modèles de ressensibilisation à la chimiorésistance.

ANNEXES

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Annexe A.1 :

Gros C, Chauvigné L, Poulet A, Menon Y, Ausseil F, Dufau I and Arimondo PB.

Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies.

(2013) *Nucleic Acids Res.* 41 (19):e185.

Annexe A.2 :

Rilova E, Erdmann A, Gros C, Masson V, Aussagues Y, Poughon-Cassabois V, Rajavelu A, Jeltsch A. Menon Y, Novosad N, Grégoire JM, Vispé S, Schambel P, Ausseil F, Sautel F, Arimondo PB and Cantagrel F.

Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino-N-(4-aminophenyl)benzamide Analogues of Quinoline-Based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation.

(2014) *ChemMedChem*, 9 (3), 590-601.

Annexe A.3 :

Erdmann A, Menon Y, Gros C, Molinier N, Novosad N, Samson A, Gregoire JM, Long C, Ausseil F, Halby L and Arimondo PB.

Design and synthesis of new non nucleoside inhibitors of DNMT3A.

(2015) *Bioorg Med Chem.* 23 (17), 5946-5953.

Annexe A.4 :

Erdmann A, Menon Y, Gros C, Masson V, Aussagues Y, Ausseil F, Novosad N, Schambel P, Baltas M and Arimondo PB.

Identification and optimisation of hydrazone-gallate derivatives as specific inhibitors of DNA methyltransferase 3A.

(2015) soumis à *Future medicinal chemistry*.

Annexe A.1.

Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies.

(2013) *Nucleic Acids Res.* 41 (19):e185.

Gros C, Chauvigné L, Poulet A, Menon Y, Ausseil F, Dufau I, Arimondo PB.

Résumé de l'article

Cet article présente la mise au point, réalisée par Christina Gros au cours de sa thèse, d'un nouveau test de l'inhibition des DNMTs basé sur la scintillation par proximité (SPA). Une automatisation de ce test a permis la réalisation d'un criblage haut-débit et d'études mécanistiques d'inhibiteurs de DNMT. Après avoir optimisé ce test sur DNMT1 et l'avoir calibré à l'aide de deux inhibiteurs connus (la sinéfungine et un duplexe d'ADN contenant de la zébularine), des études de compétition ADN et SAM, ont été réalisées, sur deux inhibiteurs de référence (la sinéfungine et un duplexe d'ADN contenant la zébularine) et sur un composé original (3-chloro-3-nitroflavanone). Dans les trois cas, le mécanisme d'action de ces molécules a été étudié vis-à-vis du SAM et de l'ADN sur DNMT1. Enfin, les résultats obtenus montrent que ce test est applicable à trois sources de DNMT différentes : la DNMT3A humaine, la DNMT bactérienne M.SssI et des extraits cellulaires.

Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies

Christina Gros, Laura Chauvigné, Anaïs Poulet, Yoann Menon, Frédéric Ausseil, Isabelle Dufau* and Paola B. Arimondo*

CNRS-Pierre Fabre USR n° 3388 ETaC, CRDPF, 3 Avenue H. Curien, 31035 Toulouse Cedex 01, France

Received May 20, 2013; Revised July 15, 2013; Accepted July 30, 2013

ABSTRACT

DNA methylation is an important epigenetic mark in eukaryotes, and aberrant pattern of this modification is involved in numerous diseases such as cancers. Interestingly, DNA methylation is reversible and thus is considered a promising therapeutic target. Therefore, there is a need for identifying new small inhibitors of C5 DNA methyltransferases (DNMTs). Despite the development of numerous *in vitro* DNMT assays, there is a lack of reliable tests suitable for high-throughput screening, which can also give insights into inhibitor mechanisms of action. We developed a new test based on scintillation proximity assay meeting these requirements. After optimizing our assay on human DNMT1 and calibrating it with two known inhibitors, we carried out *S*-Adenosyl-L-Methionine and DNA competition studies on three inhibitors and were able to determine each mechanism of action. Finally, we showed that our test was applicable to 3 other methyltransferases sources: human DNMT3A, bacterial *M.SssI* and cellular extracts as well.

INTRODUCTION

DNA methylation is an important epigenetic mark, which is essential among others for many biological processes, such as imprinting, X-inactivation, embryonic development, differentiation (1–4), maintenance of chromosomal stability (5) and gene transcription control in most eukaryotes [reviewed in (6–9)]. Consequently, abnormal patterns of DNA methylation are involved in various pathologies from neurodegenerative diseases (10,11) to cancers (12–14). Interestingly, unlike genetic mutations, epigenetic alterations are reversible and are therefore considered a promising therapeutic target (15).

In mammals, the enzymes responsible for DNA methylation are DNA methyltransferases (DNMTs), which catalyze the transfer of a methyl group from *S*-Adenosyl-L-Methionine (SAM) to the C5 position of cytosine in a CpG dinucleotide context (cytosine followed by a guanine). Three catalytically active DNMTs have been identified, DNMT1, DNMT3A and DNMT3B, whose features have been extensively described in several reviews (16–18). DNMT1 has mainly a maintenance role of DNA methylation pattern during replication because of its strong preference for hemimethylated DNA rather than unmethylated DNA (19–23), whereas DNMT3A and DNMT3B have a *de novo* methylation role (24,25). Nevertheless, it has been shown that DNMT1 collaborates with DNMT3A/3B during the *de novo* methylation process (26,27), whereas DNMT3s act also as maintenance methyltransferases in a DNMT1-deficient background (28,29) and in repetitive sequences (30–33). Hence, it is of interest to study the inhibition of both DNMT1 and DNMT3s. Here, we focused on the development of a universal and flexible DNMT assay.

Numerous enzymatic bioassays have been designed to find DNMT inhibitors. They are based on detection of the methylation reaction products, *S*-Adenosyl-L-Homocysteine (SAH) or methylated DNA [reviewed in (7)]. The quantification of SAH is often indirect and can suffer from different shortcomings. For example, SAH converting assays by coupled enzymes can reveal false positives that inhibit other enzymes than DNMTs, and therefore additional tests are needed to confirm the DNMT inhibitory activity of the hit compound (34,35). Similarly, the assay described by Graves *et al.* (36) uses an anti-SA antibody that can cross-react with SAM. Therefore, we focused only on assays quantifying methylated DNA.

Previously, we developed a test to identify Dnmt3A/3L inhibitors (37). It is based on the use of an immobilized DNA duplex containing a single CpG site, which is cleaved by a restriction enzyme when not methylated. The duplex contains a fluorophore, which is lost on

To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 5 34 50 64 92; Fax: +33 5 34 50 34 92; Email: paola.arimondo@etac.cnrs.fr
Correspondence may also be address to Isabelle Dufau. Tel: +33 5 82 95 29 71; Email: isabelle.dufau@toulouse.inra.fr

© The Author(s) 2013. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

2 *Nucleic Acids Research*, 2013

restriction cleavage when a compound inhibits DNA methylation. The assay is fully compatible with automation, and Medium Throughput Screenings have been performed on the murine Dnmt3A/3L catalytic complex (37,38), but the same assay gave poor results on DNMT1. In addition, the test is in heterogeneous phase, not allowing DNA-competition assays to investigate mechanisms of inhibition of the compounds. Thus, we preferred to develop a new test in homogeneous reaction.

To this aim, we switched to monitoring the incorporation of tritiated [^3H] methyl groups into DNA. More precisely, DNMT transfers from [methyl- ^3H] SAM the radiolabeled methyl group into the DNA duplex, and the unreacted [methyl- ^3H] SAM can be separated from the radiolabeled DNA using standard methods such as gel filtration (39), filter-binding (40) or thin layer chromatography (41). The ^3H -CH $_3$ -containing duplex can then be quantified by liquid scintillation. This radioactive assay can be applied to all DNMTs. However, this test has numerous drawbacks including significant radioactive wastes, high cost per point and low throughput. Consequently, we aimed at a new assay to quantify DNMTs inhibition, compatible with high-throughput screening (HTS). We chose a Scintillation Proximity Assay (SPA). In SPA, the scintillant is coated onto a microplate (FlashplateTM) or incorporated into beads [Yttrium silicate (YSi) or polyvinyl toluene (PVT)]. Owing to the short distance that the β -particles emitted by tritium decay can travel in aqueous medium, only the bound molecules can excite the scintillant, which limits background noise and avoids purification step. In our assay, the methylation step is performed in homogeneous phase incorporating tritiated methyl groups into a biotinylated DNA duplex. The reaction is then transferred and stopped in a streptavidin coated FlashplateTM or in a microplate containing streptavidin coated beads (Figure 1).

We characterized our system by determining the best SPA support, the methylation stop buffer, the streptavidin-biotin binding linearity range and the best duplex sequence. Subsequently, we were able to assess the inhibition activity against DNMT1 of reference compounds and proved the feasibility of SAM and DNA-competition assays. Finally, we carried out our test on 3 other DNMTs sources: human catalytic DNMT3A, bacterial M.SssI, and on cellular extracts as well.

MATERIALS AND METHODS

Materials and reagents

Two different concentrations of [methyl- ^3H] SAM (3TBq/mmol and 0.6TBq/mmol) were purchased from PerkinElmer (France) as well as MicroscintTM-20, OptiPlateTM-24, OptiPlateTM-96, streptavidin coated YSi beads, PVT beads and FlashplateTM PLUS Streptavidin 96-well scintillant coated microplates. Micro Bio-Spin[®] Columns with Bio-Gel[®] P-30 were purchased from Bio-Rad (France) and 384-well low-volume white round bottom polystyrene NBSTM microplate from Corning (France).

SAH, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), bovine serum albumin, Tris-HCl (pH 7.4) and Tween[®]-20 were bought from Sigma-Aldrich (France). SAM chloride dihydrochloride from New England Biolabs (France) other chemicals from VWR (France).

All cell lines were obtained from the ATCC and grown at 37°C, 5% CO $_2$. KG-1 cells were maintained in RPMI1640 (Lonza, France), supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza, France), and K-562 cells were maintained in IMDM (Sigma, France), supplemented with 10% foetal calf serum (Lonza, France) and 4mM L-Glutamine (Sigma, France).

Enzyme production

The sequence encoding the C-terminal domain (residues 624-912) of human DNMT3A (DNMT3A-C) was amplified by PCR from IMAGE clone (Origene) with the following primers: sense 5'-CCATGGCTCATATGA ACCACGACCAGGAATTTGAC-3' and anti-sense: 5'-CTCGAGAAGCTTTTACACACACGCAAAATACTC-3'. The amplicon was cloned into pCR[®]2.1 TOPO (InvitrogenTM, Life Technologies, France). After amplification, the plasmid was digested by *NdeI* and *HindIII*, and the resulting fragment (884pb) cloned into pET28a (Novagen[®], Merck Chemicals, Germany). The final plasmid pET28a-DNMT3A(624-912) was transformed in *Escherichia coli* BL21(DE3, pLys) (Novagen[®], Merck Chemicals, Germany) for the expression of the DNMT3A-C. Cells were amplified over night in LB medium supplemented with ampicillin and chloramphenicol antibiotics, and the protein was expressed by 4h isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside induction. Cells were collected by centrifugation for purification according to Jeltsch *et al.* and Jia *et al.* (41,42). DNMT3A-C purity was assessed by Coomassie-stained SDS gels and estimated to be >90%. Finally, total proteins concentration was determined by Bradford assay as 1.11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (28.3 μM).

His-DNMT1 (182 kDa, human) was cloned, expressed and purified as described by Lee *et al.* (43). The concentration of total proteins was determined by Bradford assay as 1.72 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (9.45 μM). M.SssI was purchased from New England Biolabs (France) at 4000 U/mL and was supplied with NEBuffer 2.

Duplex formation and cellular extracts

Oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Belgium). Duplexes were formed by hybridization of the two complementary strands in sterilized water according to standard procedures.

Cellular extracts were obtained according to Fritsch *et al.* (44). Briefly, we used 10 billion cells (dried pellet), which were resuspended in a hypotonic buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.65), 1.5mM MgCl $_2$, 10mM KCl) and disrupted with 20 strokes of a tight-fitting Dounce homogenizer. At the end of cell lysis, sucrose, spermidine and spermine-containing buffer was added to limit nuclei leak. The cytosolic fraction was separated from nuclei by 7 min centrifugation at 4°C at 9000 rpm. The soluble

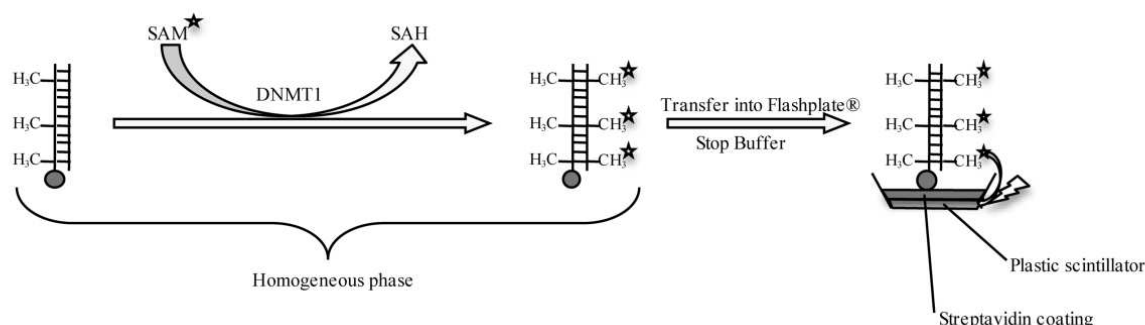


Figure 1. DNMT1 Flashplate™ SPA principle. Biotin is represented as a gray circle, tritium atoms as stars and the lightning represents the ability of a tritium atom to excite the plastic scintillator. In homogeneous phase, the hemimethylated duplex is methylated by the studied DNMT. The biotin is then captured and the methylation reaction is stopped on a streptavidine-coated Flashplate™. Only the bound $^3\text{H-CH}_3\text{-DNA}$ can excite the coated scintillant and emit a signal.

nuclear extract (SNE) was obtained by incubation of the nuclear pellet in a high salt buffer (900 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7.65), 25% glycerol, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA), to obtain a final concentration of 300 mM NaCl, for 30 min at 4°C and centrifugation at 10 000 rpm, 4°C for 10 min. The resulting pellet, which corresponds to chromatin fraction (nuclear chromatin extract (NCE)), was resuspended and digested with micrococcal nuclease (cat# N3755, Sigma, France). Soluble nuclear and chromatin fractions were then ultracentrifuged at 32 000 rpm for 1 h at 4°C, and protein concentration was determined by Bradford assay. The presence of DNMT1 and DNMT3A in both fractions was verified by a western blot (DNMT1 antibody NB100-264 from Novus Biological, UK, and DNMT3A antibody CST3598 from Cell Signaling, USA) as described in the Supplementary Information.

Enzymatic assays

The radioactive gel filtration assay was carried out in 50 μL of total reaction volume, containing the tested compound (up to 1% DMSO), 0.28 μM of [methyl- ^3H] SAM (3 TBq/mmol), 0.2 μM of DNA duplex (Dup_0, Table 1) and 90 nM of His-DNMT1 in reaction buffer [20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (pH 7.2), 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA (bovine serum albumin)]. The reaction was incubated at 37°C for 2 h, then the unreacted [methyl- ^3H] SAM and the enzyme were separated from $^3\text{H-CH}_3\text{-containing}$ DNA by passing through a Micro Bio-Spin® P-30 column. The filtrate was then transferred into a white opaque 24-well OptiPlate™, 1 mL of Microscint™-20 was added, and the microplate was read on TopCount NXT (PerkinElmer, France).

In the Flashplate™ assay, the reaction was performed in a 10 μL of total reaction volume in low-volume NBS™ 384-well microplates, containing the tested compound (up to 1% DMSO), 1 μM of a SAM/[methyl- ^3H] SAM (3 TBq/mmol) mix in a ratio of 3-to-1 (isotopic dilution 1*:3), 0.3 μM of biotinylated DNA duplex (Dup_1 hmC for DNMT1, Dup_1 nmC for DNMT3A and M.SssI, Table 1), and 90 nM of DNMT1, 1 μM of DNMT3A or 100 nM of M.SssI. For DNMT1 and DNMT3A, the

reaction was incubated at 37°C for 2 h in the aforementioned reaction buffer, whereas the M.SssI methylation reaction was carried out in 1X NEBuffer 2 for 1 h at 37°C. Eight μL are then transferred into a streptavidin 96-well scintillant coated Flashplate™ containing 190 μL of 20 μM SAH in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). The Flashplate™ was agitated at room temperature for 1 h, washed three times with 200 μL of 0.05% Tween®-20 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), and read in 200 μL of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) on TopCount NXT. We performed all our measurements in 96-well Flashplate™, as our TopCount did not possess the module allowing lecture of 384-well microplates.

The YSi and PVT beads tests followed the same protocol. After the incubation at 37°C, 8 μL were transferred into a white 96-well OptiPlate™ containing 190 μL of 20 μM SAH in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 200 μg of YSi beads or 400 μg of PVT beads. The microplate was then read on TopCount.

For the Flashplate™ assay on cellular extracts, the methylation step was performed in a 10 μL of total reaction volume in low volume NBS™ 384-well microplates, containing the tested compound, 1 μM of [methyl- ^3H] SAM (3 TBq/mmol), 0.3 μM of biotinylated DNA duplex (Dup_1 hmC or nmC, Table 1) and 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of K-562 SNE in the reaction buffer. The reaction was incubated at 37°C for 2 h, and 8 μL are then transferred into a streptavidin 96-well scintillant coated Flashplate™ containing 190 μL of 20 μM SAH in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). The Flashplate™ was agitated at room temperature for 1 h, washed three times with 200 μL of 0.05% Tween®-20 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), and read in 200 μL of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) on TopCount. For the heat inactivated controls, the 5X solutions of 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were heated at 95°C for 10 min.

For every assay, 40 000 total counts were accumulated for each well, with a maximum time limit of counting fixed at 10 min per well. All signals were expressed in counts per minute (cpm).

Determination of IC_{50} values and K_m values

The concentration at which 50% of inhibition is observed (IC_{50}) was determined by analysis of a concentration range

Table 1. Sequences of tested duplexes.

Duplex Name	Number of CpG	Sense	Anti-sense
Dup_0	8	5'-GATmCGCmCGATGmCGmCGAAmTmCGmCGATmCGATGmCGAT-3'	5'-ATCGCATCGATCGCGATTCGCGCATCGGGCGATC-3'
Zebularine-containing duplex	8	5'-GATmCGCmCGATGmCGmCGAAmTmCGmCGATmCGATGmCGAT-3'	5'-ATZebGATZebGATZebGZebGATTCZebGZebGCGATZebGGZebGATC-3'
Dup_1 hmc	8	5'-GATmCGCmCGATGmCGmCGAAmTmCGmCGATmCGATGmCGAT-3'	BIOT-5'-ATCGCATCGATCGCGATTCGCGCATCGGGCGATC-3'
Dup_1 nmC	8	5'-GATCGCCGATCGCGAAmTCGCGATCGATGCGAT-3'	BIOT-5'-ATCGCATCGATCGCGATTCGCGCATCGGGCGATC-3'
Dup_2 hmc	1	5'-GCTATATATACGTACTGTGTAACCTACCAGACATGCACTG-3'	BIOT-5'-CAGTGCATGTCTGTAGGGTTCAACAGTAmCGTATATATAGC-3'
Dup_2 nmC	1	5'-GCTATATATACGTACTGTGTAACCTACCAGACATGCACTG-3'	BIOT-5'-CAGTGCATGTCTGTAGGGTTCAACAGTACGTATATATAGC-3'
Dup_3	1	5'-GCATATATATGAmCGATCCTGTAGGTCACTACCAGACATGCACCTG-3'	BIOT-5'-CAGTGCATGTCTGTAGTGACCTACAGGATCGTGATATATAGC-3'
Dup_4	1	5'-GGAGGCCmCGCCTGCTGTAGGTCACTACCAGACATGCACCTG-3'	BIOT-5'-CAGTGCATGTCTGTAGTGACCTACAGCAGGGCGGCTTCC-3'
Dup_5	1	5'-TCCTGTGAGCCTCCmCGCAGGTCACTACCAGACATGCACTG-3'	BIOT-5'-CAGTGCATGTCTGTAGTGACCTGCGGAGGCTCACAGGA-3'

hmC, hemi-methylated cytosine; nmC, non-methylated cytosine; BIOT, biotin; Zeb, zebularine.

For K_m determination, one substrate was varied while maintaining the other at a saturating concentration. SAM (0.6TBq/mmol) was varied from 0.25 to 20 μ M with an isotopic dilution of 1*:1, whereas the DNA duplex concentration was kept at 1.0 μ M. DNA duplex concentration was titrated from 0.05 to 1.0 μ M, whereas SAM was held at 15 μ M (1*:2) total. All reactions were performed in duplicates. The K_m value of each substrate was then determined by non-linear fitting of the data with the Michaelis-Menten equation on GraphPad Prism 4.03.

Competition studies

In SAM-competition assays, SAM (0.6TBq/mmol) was varied between 0.5 and 15 μ M with an isotopic dilution of 1*:1 at a fixed DNA duplex concentration of 1.0 μ M. For each SAM concentration, the tested compound concentration was adjusted between its IC₁₀ and its IC₈₀.

In DNA-competition assays, the DNA duplex concentration was varied between 0.05 and 1.0 μM , whereas SAM (0.6 TBq/mmol) concentration was held at 15 μM with an isotopic dilution of 1*:2. For each DNA duplex concentration, the tested compound concentration was adjusted between its IC_{10} and its IC_{80} .

For each substrate concentrations, the IC_{50} of tested compound was calculated by non-linear regression fitting with sigmoidal dose response (variable slope). For each compound concentration, K_m^{app} and V_m^{app} of each substrate were approximated by non-linear fitting of the data with the Michaelis-Menten equation on GraphPad Prism 4.03.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the Flashplate™ assay

The following steps of the assay (Figure 1) were optimized on DNMT1.

Methylation reaction stop

First, we assessed several stop methods to ensure that the reaction does not proceed during the streptavidin-biotin binding step. This issue was addressed on the previously developed radioactive gel filtration assay (39). Addition of MgCl_2 (from 1 to 100 mM) or NaCl (from 0.5 to 1 M), known to inhibit DNMT (45), did not block the methylation reaction (data not shown). Acidification of the solution (4–5 decrease in pH) by adding concentrated HCl resulted in a drastic signal loss, probably due to DNA degradation. Heat inactivation was not investigated because it is poorly compatible with automation. Lastly, SAM (from 15 to 200 μM) or SAH (from 20 to 100 μM)

were added with success, the first to compete with radiolabeled SAM, the latter being a well-known inhibitor of DNMTs as product of the methylation reaction. Finally, we chose to use as stop buffer 20 μ M SAH in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) solution.

Comparison of SPAs supports

Second, as several SPA supports are commercially available, YSi beads, PVT beads and FlashplatesTM were compared. To this purpose, the methylation reaction was performed with Dup_1 hmC (Table 1) according to the radioactive gel filtration protocol (39). Three aliquots of 35 μ L were withdrawn and transferred into a FlashplateTM or into a 96-well microplate containing 200 μ g of YSi beads or 400 μ g of PVT beads, respectively. All the wells contained a final volume of 200 μ L of a 20 μ M SAH in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). After 1 h of streptavidin-biotin binding, the samples were read on a liquid scintillation counter. The best maximal signal was obtained with YSi beads at 165 000 cpm, against 125 000 cpm for FlashplateTM and 80 000 cpm for PVT beads. The signal-to-background ratio was way better for FlashplateTM (>400) than for YSi beads or PVT beads, both about 145 (Supplementary Figure S1A). In addition, the use of beads can induce more variability because of the difficulty to suspend them homogeneously. Moreover, YSi and PVT beads assays are twice more expensive than FlashplateTM test for equivalent performances. Therefore, FlashplateTM were the best compromise between sensitivity, signal-to-background ratio, cost and convenience. Besides, it allowed us to reduce the [methyl-³H] SAM amount and the total reaction volume.

Binding linearity and duplex choice

Third, we assessed the linearity of biotin-streptavidin binding in FlashplatesTM by transferring aliquots of different volumes after the methylation reaction. For this optimization, the methylation reaction was performed according to the radioactive gel filtration protocol (39) with the use of Dup_1 hmC (Table 1). After 2 h of incubation, aliquots of different volumes were transferred into a FlashplateTM to a final 200 μ L volume of 20 μ M SAH in Tris-HCl (Supplementary Figure S1B). This binding step was linear up to 4 pmol of transferred biotinylated duplex. Therefore, we adjusted the volume to be transferred into the FlashplateTM according to the biotin concentration in the methylation reaction in order not to exceed this limitation.

Several duplexes were tested to identify the best DNMT1 target (Table 1). Dup_1 contained 8 CpGs and was used previously in the radioactive gel filtration assay (39). Sequences of Dup_2 and Dup_3 were described by Ceccaldi *et al.* (37), for DNMT3A and DNMT1, respectively, and displayed only one CpG site. Dup_4 and Dup_5 were designed after those used by Song *et al.* (23,46) for DNMT1 crystallization and in enzymatic assays, bearing one single CpG site.

The influence of the hemi or non-methylated status of the DNA duplex was confirmed. In agreement with the literature (19,21,22), DNMT1 had a strong preference for hemimethylated substrates, as illustrated by the

difference in methylation of hemimethylated Dup_1 and hemimethylated Dup_2 compared with non-methylated Dup_1 and non-methylated Dup_2 (Figure 2). We compared the duplexes among them by calculating the CpGs concentration; thus, 0.3 μ M of 8 CpG-containing duplex were compared with 2.4 μ M of 1 CpG-containing DNA. Overall, for each duplex tested, we observed that the intensity of the signals at 2.4 μ M concentration was lower than those measured at 0.3 μ M concentration (Figure 2), suggesting a possible inhibition by an excess of substrate. Finally, we chose the hemimethylated duplex Dup_1, which gave the best results and had the advantage of displaying more than 1 CpG site and thus increasing the amount of transferred ³H-CH₃ for the same amount of biotin.

Optimization of the conditions for the methylation reaction by DNMT1

To optimize the DNMT1 FlashplateTM assay, we performed an enzymatic titration and studied the kinetics of the reaction at 37°C and at room temperature to limit evaporation. As 90 nM of enzyme gave the highest signal in the linear response range (Supplementary Figure S2A), it was chosen as concentration for the assay. Room temperature kinetics resulted in weak signals; therefore, the methylation reaction was performed at 37°C for 2 h, for which the response of the enzyme was both linear and maximal (Supplementary Figure S2B).

Next the K_m of the two substrates SAM and DNA was measured. To determine the K_m , we used the Michaelis-Menten model in a SAM concentration range spanning from 0.25 to 20 μ M, whereas the DNA concentration was kept near saturating concentration at 1.0 μ M (Figure 3A). The K_m of DNA was determined by using the same fitting model with a DNA concentration range spanning from 0.05 to 1.0 μ M and near saturating SAM concentration at 15 μ M (Figure 3B). The approximated

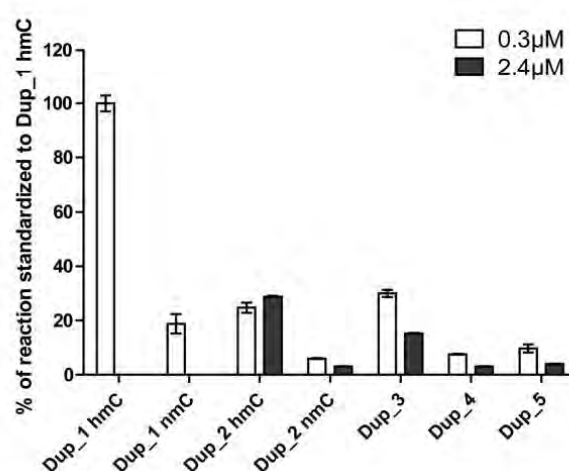


Figure 2. Comparison of different duplexes for DNMT1 methylation assay. Means \pm standard deviation of duplicates are displayed. hmC stands for hemimethylated duplex and nmC stands for non-methylated duplex.

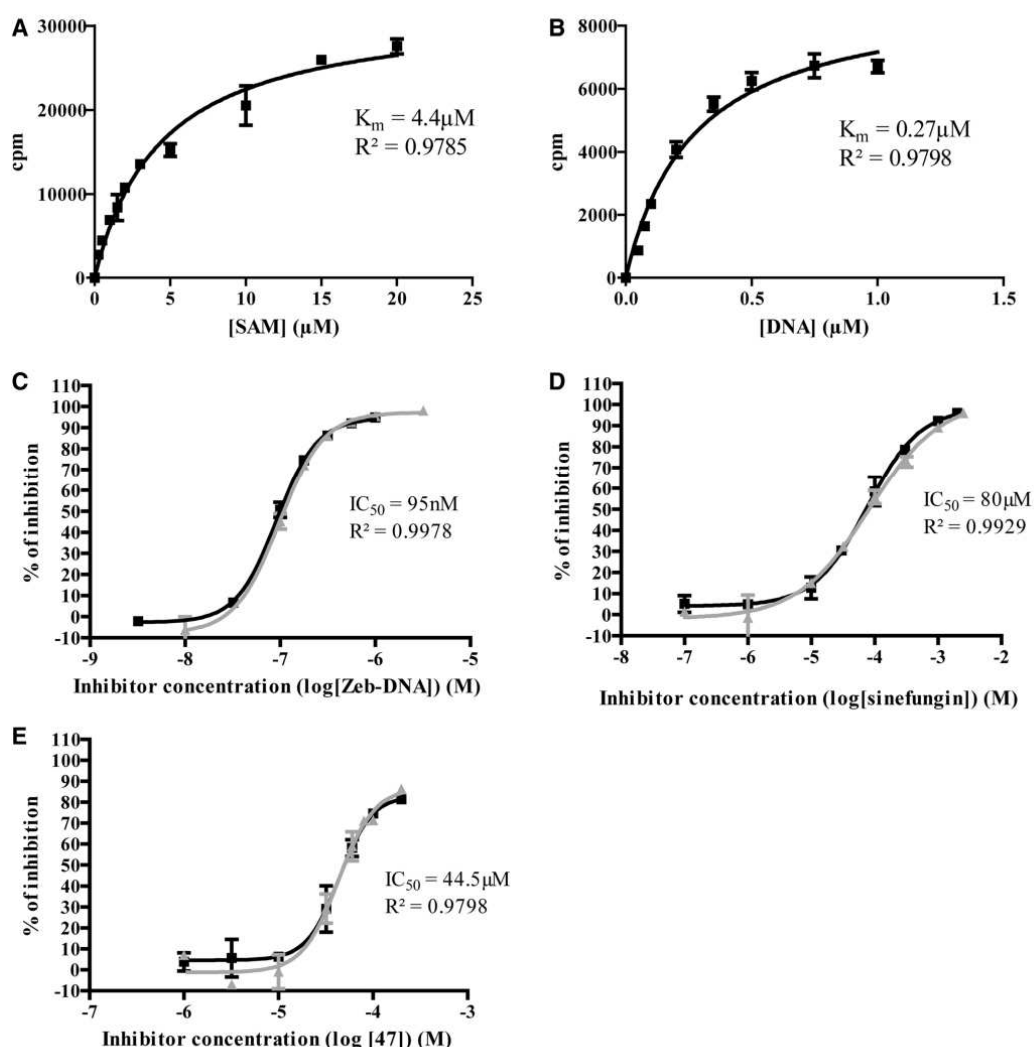


Figure 3. Characterization of the DNMT1 assay and inhibition studies on reference compounds. (A) Determination of SAM K_m at 1.0 μM of hemimethylated Dup_1. (B) Determination of DNA K_m at 15 μM of [methyl- 3H] SAM. (C) Two independent dose-response curves for zebularine-containing duplex, each in duplicates. (D) Two independent dose-response curves for sinefungin, each in duplicates. (E) Two independent dose-response curves for 47, each in duplicates. K_m and coefficient of determination (R^2) are displayed. Means of IC_{50} and coefficient of determination (R^2) are displayed.

K_m values were $4.4 \pm 0.5 \mu M$ and $0.27 \pm 0.03 \mu M$ for SAM and DNA, respectively. It is established that to maximize opportunities of identifying the full constellation of inhibitory molecules (competitive, non-competitive or uncompetitive), the optimal concentration of substrates is the K_m value (47). We thus chose to conduct the assay at the K_m value for biotinylated DNA and at $K_m/4$ for [methyl- 3H] SAM. This latter choice was dictated by the fact that it was too expensive to work at K_m value for [methyl- 3H] SAM, even with an isotopic dilution of 1*:3.

Z' factor

Finally, this resulted in a new optimized DNMT1 inhibition assay on FlashplateTM. To assess the reliability of our test, we determined the Z' factor. This factor is a statistical

parameter that evaluates the quality of an HTS assay. It is defined as $1 - (3SD_{pos} + 3SD_{neg}) / (\mu_{pos} - \mu_{neg})$ where SD_{pos} is the standard deviation of positive controls, SD_{neg} is the standard deviation of negative controls, μ_{pos} is the mean of positive controls, and μ_{neg} is the mean of negative controls (48). In our case, it resulted in $Z' = 0.88$, which is characteristic of a good and reliable assay.

Tolerance to DMSO

As DMSO is widely used as solvent for chemical compounds in HTS, we assessed the DMSO tolerance of our FlashplateTM assay. Surprisingly, a slight stimulation (<10%) of DNMT1 activity was observed when adding 1 to 10% (v/v) of DMSO and then inhibition when adding 15 to 50% (v/v) (Supplementary Figure S3). Yokochi and

Robertson hypothesized that the stimulation by DMSO is probably due to two types of interactions: DMSO-DNA and DMSO-SAM (45). We recommend not to exceed a final 1% (v/v) DMSO concentration. However, if needed (e.g. because of compound solubility), it is still possible to perform experiments in up to 10% (v/v) DMSO, with adjusting the corresponding controls.

Inhibition studies on DNMT1

Reference inhibitors

As the aim of our study was to evaluate the inhibitory activity of small chemical molecules, we validated it with three different inhibitors of the literature: sinefungin (49,50), zebularine-containing DNA (51) and 3-chloro-3-nitroflavanone **47** (37). Sinefungin is a bacterial analog of SAM and SAH and act as a SAM competitor (49,50). Zebularine, which is a nucleoside analog of cytidine, was used as DNA competitor, as it binds strongly but reversibly to the DNMT (51). In the zebularine-containing DNA, each cytidine in a CpG context on the anti-sense strand of Dup₁ was replaced by zebularine (Table 1). Finally, we previously identified compound **47** as a DNMT inhibitor (37).

For each compound, a classical sigmoidal dose-response curve spanning from 0 to nearly 100% of inhibition was obtained (Figure 3C–E). IC₅₀ were approximated with narrow confidence interval and are reported in Table 2. The reproducibility of the assay was assessed by two independent experiments run each in duplicates (Figure 3C–E). Based on these good performances, the FlashplateTM assay was therefore considered validated for screening studies on DNMT1.

SAM-competition studies

The assay was also developed with the aim to perform competition experiments with the 2 substrates, SAM and DNA. Thus, the assay ability to determine inhibitory mechanism was assessed on the reference inhibitors. Sinefungin was varied from IC₁₀ to IC₈₀ and, for each concentration, SAM concentrations spanned from 0.5 to 15 μ M.

For each SAM concentration, we approximated the IC₅₀ of sinefungin, and we plotted it against [SAM]/K_m^{SAM} (Figure 4A). As displayed, the IC₅₀ increased with SAM concentration, corresponding to a SAM-competitive inhibitor (47). To further confirm this, the K_m^{app} and V_m^{app} values for each sinefungin concentration were

extrapolated using the Michaelis–Menten equation. K_m^{app} plotted against sinefungin concentration gave aligned points with a linear regression coefficient (R²) superior to 0.98 (Figure 4C), confirming the SAM-competitive behavior (52). Hence, both methods are consistent with literature indicating that sinefungin is a SAM competitor (49,50).

We then studied the zebularine-containing duplex. The IC₅₀ seemed independent of the [SAM]/K_m^{SAM} (Figure 4B), indicating a SAM non-competitive behavior (47). Moreover, Michaelis–Menten fitting resulted in an overall constant K_m^{app} (Figure 4D) and a linearly increasing 1/V_m^{app} (R² > 0.92, Figure 4F) when plotted against the inhibitor concentration. In addition, plotting of 1/K_m^{app} against the inhibitor concentration gave no linear dependency (Figure 4H), excluding a hypothetical uncompetitive behavior. These results are consistent with a SAM non-competitor as expected for a DNA competitor.

The FlashplateTM assay was able to discriminate between competitive and non-competitive inhibition for two reference inhibitors. Therefore, we applied the method to compound **47** to determine its mechanism of action. Plotting IC₅₀ against [SAM]/K_m^{SAM} showed that compound **47** might be a SAM non-competitive or uncompetitive as the curve slightly decreased with [SAM]/K_m^{SAM} (Figure 4A) (47). Similarly to the zebularine-containing duplex, K_m^{app} and 1/K_m^{app} plots against inhibitor concentration did not give linear dependency (Figure 4C and G), whereas 1/V_m^{app} as a function of **47** concentration gave aligned points with R² superior to 0.99 (Figure 4E). These data clearly indicated that compound **47** is a SAM non-competitive inhibitor.

DNA-competition studies

In parallel, DNA competition experiments were carried out on DNA concentrations from 0.05 to 1.0 μ M at a constant 15 μ M SAM concentration with a 1*:2 isotopic dilution. First, we evaluated the zebularine-containing duplex, varying from IC₁₀ to IC₈₀. The IC₅₀ increased with [DNA]/K_m^{DNA} (Figure 5B), as the K_m^{app} with inhibitor concentration (R² > 0.97), confirming a DNA-competitive behavior as expected.

Then we studied sinefungin whose plot of IC₅₀ against [DNA]/K_m^{DNA} displayed a decreasing branch of hyperbola (Figure 5A), consistent with an uncompetitive inhibition (47). The Michaelis–Menten analysis confirmed this tendency, with a linear dependency of 1/V_m^{app} and 1/K_m^{app} on the inhibitor concentration (R² > 0.97, Figure 5E and G).

In agreement, we have identified a SAM-competitor that is DNA-uncompetitive (sinefungin) and a DNA-competitor that is SAM non-competitive (the zebularine-containing duplex). These results seem to suggest that DNMT1 proceeds according to an ordered sequential mechanism (53), where DNA binds first, followed by SAM, consistent with previous results (54,55). However, this remains a hypothesis, as we cannot exclude that DNMT1 was co-purified with some SAM and DNA.

As the method was validated on reference compounds, it was then applied to flavanone **47**. Similar results as with

Table 2. Inhibitory activities of reference compounds on DNMT1

Inhibitors	DNMT1 IC ₅₀ (μ M) \pm standard deviation
Sinefungin	80 μ M \pm 4
Compound 47	44.5 μ M \pm 0.6
Zebularine-containing duplex	0.095 μ M \pm 0.004

Means of two independent experiments are displayed \pm standard deviation. IC₅₀ were assessed from dose-response curves of each compounds, for 0.3 μ M of Dup₁ hmC (Table 1), 1 μ M SAM (isotopic dilution of 1*:3), 90 nM DNMT1.

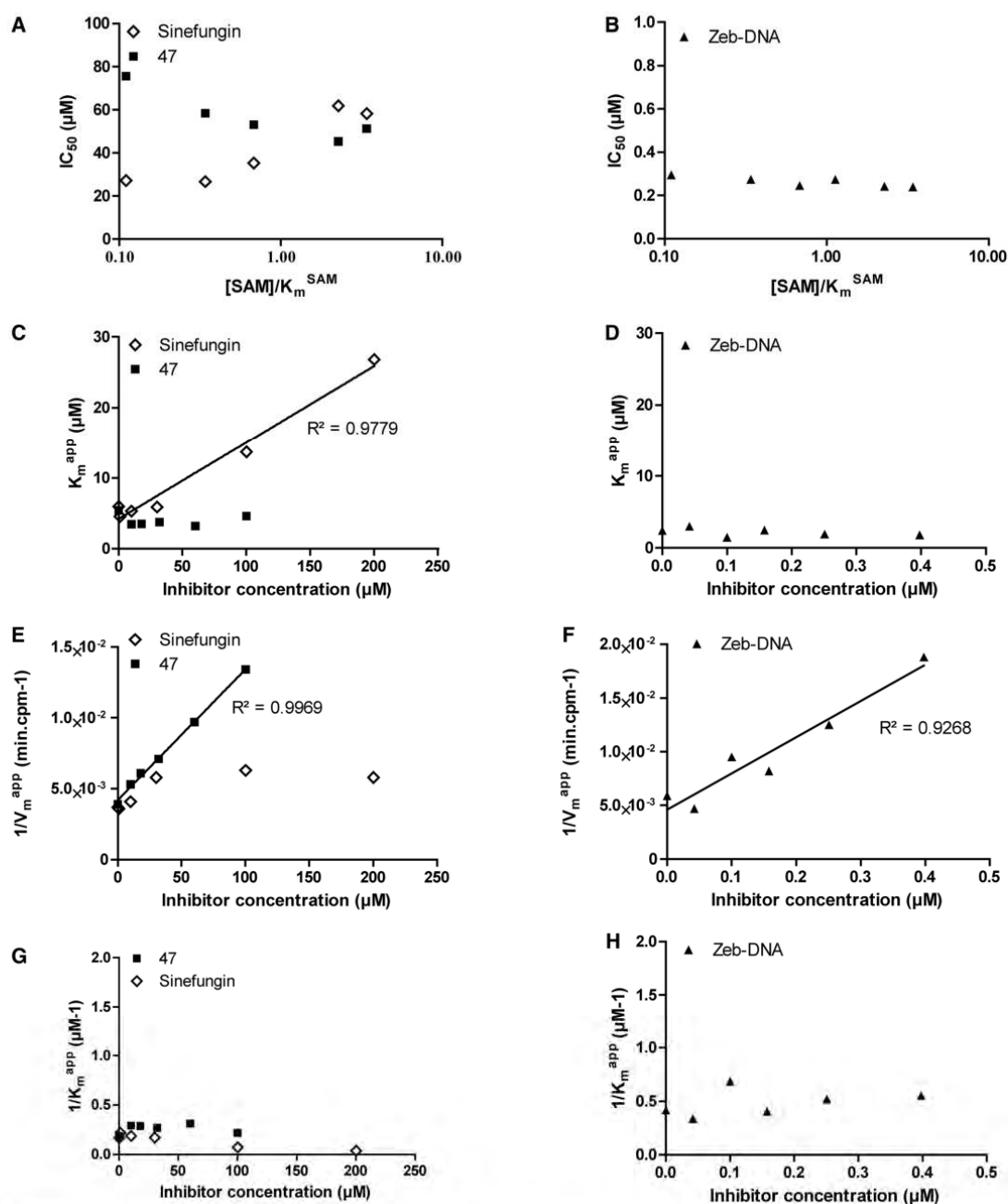


Figure 4. SAM-competition assays on DNMT1 with sinefungin, zebularine-containing duplex and compound 47. Experiments with sinefungin are represented by open diamonds, zebularine-containing duplex by plain triangles and compound 47 by plain squares. (A and B) IC_{50} of each molecule as function of $[DNA]/K_m^{DNA}$. (C and D) K_m^{app} as function of [inhibitor]. (E and F) $1/V_m^{app}$ as function of [inhibitor]. (G and H) $1/K_m^{app}$ as function of [inhibitor]. For each linear regression, if the slope is significantly different from 0, then the regression is represented by a plain line, and the coefficient of determination (R^2) is displayed along the corresponding line.

sinefungin were obtained: IC_{50} against $[DNA]/K_m^{DNA}$ was compatible with both non-competitive or uncompetitive inhibition (Figure 5.A), whereas $1/V_m^{app}$ and $1/K_m^{app}$ clearly identified an uncompetitive behavior ($R^2 > 0.97$, Figure 5E and G).

In agreement with literature, we have confirmed that sinefungin was a SAM-competitive and DNA-uncompetitive inhibitor (49,50), whereas the zebularine-containing duplex was qualified as a SAM non-competitor and DNA-competitor (51). Our assay was also able to

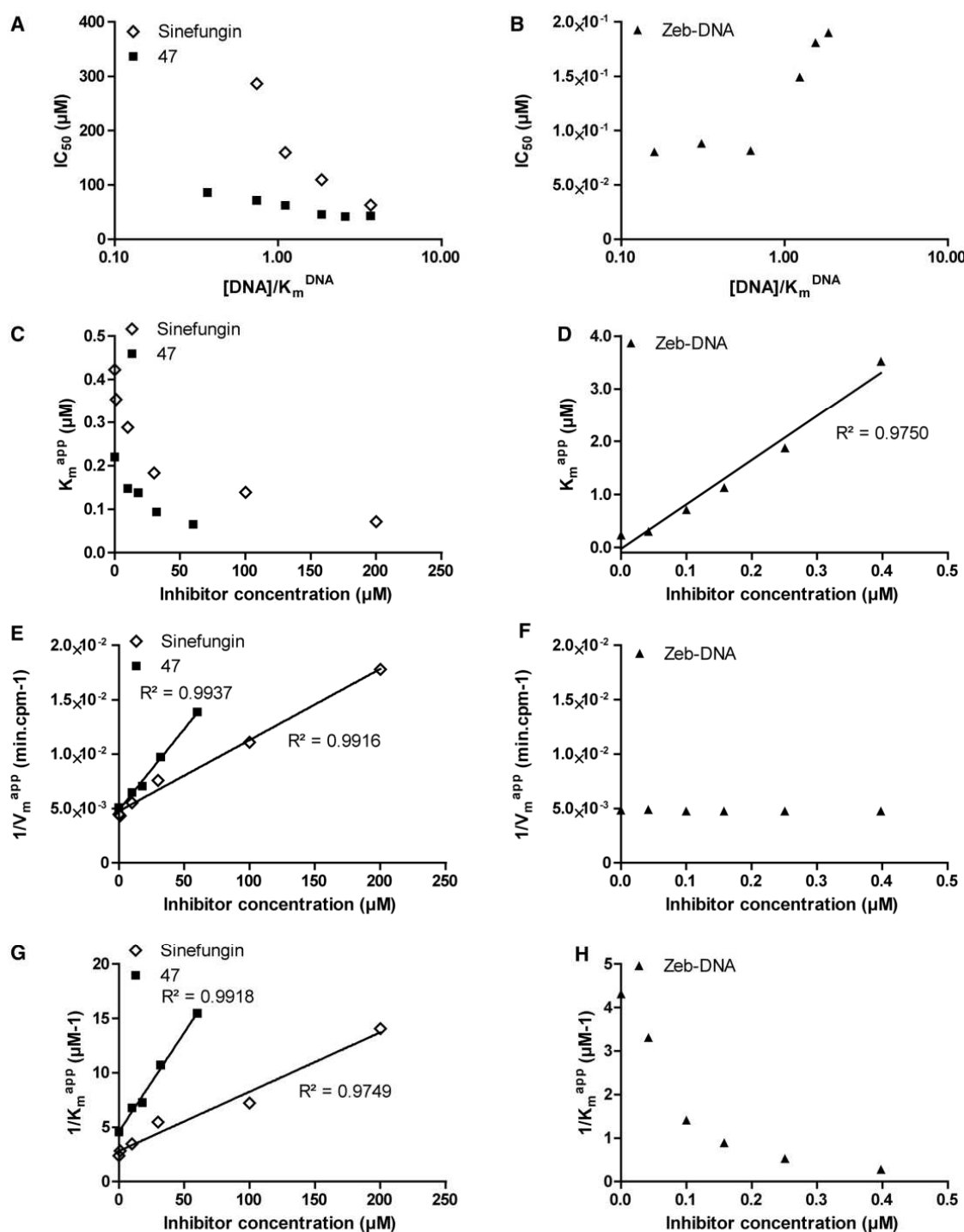


Figure 5. DNA-competition assays on DNMT1 with sinefungin, zebularine-containing duplex and compound 47. Experiments with sinefungin are represented by open diamonds, zebularine-containing duplex by plain triangles and compound 47 by plain squares. (A and B) IC_{50} of each molecule as function of $[DNA]/K_m^{DNA}$. (C and D) K_m^{app} as function of [inhibitor]. (E and F) $1/V_m^{app}$ as function of [inhibitor]. (G and H) $1/K_m^{app}$ as function of [inhibitor]. For each linear regression, if the slope is significantly different from 0, then the regression is represented by a plain line, and the coefficient of determination (R^2) is displayed along the corresponding line.

identify the inhibitory mechanism of 3-chloro-3-nitroflavanone **47**, which seemed to be SAM non-competitive and DNA-uncompetitive. Hence, the Flashplate™ assay is validated for screening and for mechanistic studies. To address the selectivity question, we tested it on two other C5 DNMTs (human DNMT3A and bacterial M.SssI) and on cellular extracts.

Applications to other DNMTs and cellular extracts

Application of the assay to nuclear extracts

The assay was also adapted to measure DNMT activities in NCE and SNE from leukemia K-562 cell line, known to be sensitive to demethylation (56,57). NCE and SNE were tested for DNA methylation on both the hemimethylated and unmethylated duplex (Dup_1 hmC and nmC, Table 1, Figure 6A). Due to low signals, we chose to test nuclear extracts in our assay without isotopic dilution at final concentration of 1 μM [methyl- ^3H] SAM. This loss in signal may be due to the dilution of the tritiated SAM by the cellular non-radioactive SAM.

The control of heat inactivated extracts did not display any activity (labeled 'inact' in Figure 6A), whereas NCE and SNE displayed a dose response on hemimethylated duplex. The fact that SNE signals were higher than NCE signals can be explained by the presence of more DNMT1 in SNE than in NCE, as shown in the corresponding western blot (Supplementary Figure S4).

Interestingly, the signals recorded with unmethylated duplex were lower (Figure 6A), which correlates with the poor activity of DNMT1 on unmethylated duplex and the low quantity of DNMT3s in these nuclear extracts (Supplementary figure S4). Therefore, we decided to work at 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of K-562 SNE on hemimethylated Dup_1 (hmC Dup_1) to test the reference inhibitor sinefungin.

Sinefungin gave full dose-response curve from 0 to 100% of inhibition with good reproducibility and narrow confidence interval (IC_{50} : $51 \pm 6 \mu\text{M}$, mean of two experiments each run in duplicates \pm standard deviation, Figure 6B). This result proves that studying the inhibition of DNA methylation in cellular extract is achievable with the protocol developed here.

Application of the assay to other C5 DNMTs

The assay was easily adapted to human DNMT3A and M.SssI. As both enzymes are able to react on unmethylated DNA duplexes, they were tested on unmethylated Dup_1 (Dup_1 nmC, Table 1).

Titration of DNMT3A displayed a response linearity range between 0 and 1.5 μM , whereas M.SssI had a linear response up to 120 nM (data not shown). Therefore, we chose 1 μM of enzyme for DNMT3A and 100 nM for M.SssI.

Sinefungin was assayed on both enzymes and gave full dose-response curves from 0 to nearly 100% of inhibition

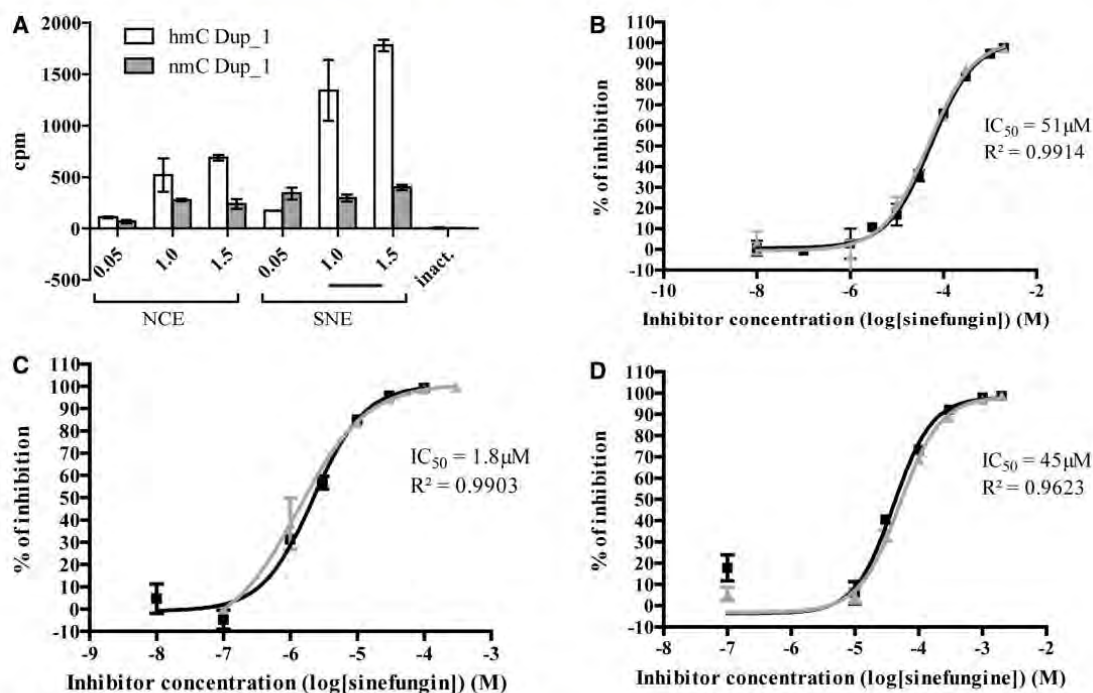


Figure 6. Application of the assay to K-562 nuclear extracts and other C5 DNMTs. (A) Increasing amounts of NCE and SNE from K-562 cells have been tested for DNA methylation activity using Dup_1 hmC and nmC (Table 1). The experiment was performed in duplicates. Means are represented with standard deviation. (B) Two independent dose-response curves for sinefungin on K-562 SNE, each in duplicates. (C) Two independent dose-response curves for sinefungin on DNMT3A-C, each in duplicates. (D) Two independent dose-response curves for sinefungin on M.SssI, each in duplicates. Means of IC_{50} and coefficient of determination (R^2) are displayed.

with satisfactory confidence intervals and good reproducibility (IC_{50} : $1.8 \pm 0.6 \mu M$ on DNMT3A and $45 \pm 7 \mu M$ on M.SssI, means of two experiments each run in duplicates \pm standard deviation, Figure 6C and D).

Altogether, these data confirm that the assay can be applied to cellular extracts and other C5 DNMTs.

CONCLUSION

The existing *in vitro* DNMTs tests suffer from different shortcomings, whether measuring the SAH or the methylated DNA production. On one hand, SAH quantification is applied to both histone methyltransferases and DNMTs (34–36). However, they can reveal false positive due to cross-reaction between SAM and anti-SAH antibody or to inhibition of enzymes that convert SAH into ATP. On the other hand, measurement of methylated DNA is performed either in heterogeneous phase, preventing any competition study, or in radioactive homogeneous phase but with high costs per point and large radioactive waste.

We here described a DNMT1 FlashplateTM assay that was miniaturized in final 10 μL of reaction volume, then optimized and finally shows good reliability and sensitivity, with signal-to-background ratios up to 400 and a calculated Z' factor of 0.88. This assay is able to monitor inhibition activities on DNMT1, DNMT3A and M.SssI of small molecules with satisfactory dose-response curves. It can also be applied to screen microorganism extracts (data not shown) and different source of enzymes such as purified DNMTs or cellular extracts. This assay is fully compatible with automation and can be easily adapted to HTS. In addition, it provides insights on the inhibition mechanisms of compounds, on SAM and DNA-competition studies, as we were able to confirm SAM-competitive and DNA-competitive inhibition of sinefungin and zebularine-containing DNA, respectively (49–51). Moreover, we were able to characterize the mechanism of action of 3-chloro-3-nitroflavanone **47**, previously identified as a DNMT inhibitor (37), which appeared to be a SAM non-competitor and DNA-uncompetitor. Therefore, this assay can be useful either as a screening test in HTS or in mechanistic studies of a lead molecule.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Albert Jeltsch and his laboratory (Biochemistry Department Stuttgart University) for the protocol of DNMT3A purification. The authors thank Ahmed El Marjou (Institut Curie, Paris, France) for human DNMT1 production.

FUNDING

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) [ATIP to P.B.A.]; and Région Midi Pyrénées [Equipe

d'Excellence to P.B.A. and FEDER CNRS/Région Midi Pyrénées to P.B.A.]. Funding for open access charge: CNRS, France.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y. and Li, E. (2007) Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat. Genet.*, **39**, 391–396.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. and Jaenisch, R. (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, **300**, 455.
- Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, **300**, 489–492.
- Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S. *et al.* (2009) Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.*, **81**, 155–164.
- Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2395–2402.
- Espada, J. and Esteller, M. (2010) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 238–246.
- Gros, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Erdmann, A., Gregoire, J.M., Ausseil, F., Vispe, S. and Arimondo, P.B. (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*, **94**, 2280–2296.
- Margueron, R. and Reinberg, D. (2010) Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 285–296.
- Sharma, S., Kelly, T.K. and Jones, P.A. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, **31**, 27–36.
- Fuso, A., Nicolai, V., Cavallaro, R.A. and Scarpa, S. (2011) DNA methylase and demethylase activities are modulated by one-carbon metabolism in Alzheimer's disease models. *J. Nutr. Biochem.*, **22**, 242–251.
- Qureshi, I.A. and Mehler, M.F. (2011) Advances in epigenetics and epigenomics for neurodegenerative diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **11**, 464–473.
- Feinberg, A.P. (2008) Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*, **299**, 1345–1350.
- Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 2042–2054.
- Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell*, **128**, 683–692.
- Ramchandani, S., Bhattacharya, S.K., Cervoni, N. and Szyf, M. (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 6107–6112.
- Cheng, X. and Blumenthal, R.M. (2010) Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*, **49**, 2999–3008.
- Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P. and Jeltsch, A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBiochem*, **12**, 206–222.
- Svedruzic, Z.M. (2008) Mammalian cytosine DNA methyltransferase Dnmt1: enzymatic mechanism, novel mechanism-based inhibitors, and RNA-directed DNA methylation. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 92–106.
- Bacolla, A., Pradhan, S., Roberts, R.J. and Wells, R.D. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated DNA. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33011–33019.
- Bashtrykov, P., Jankevicius, G., Smarandache, A., Jurkowska, R.Z., Ragozin, S. and Jeltsch, A. (2012) Specificity of Dnmt1 for methylation of hemimethylated CpG sites resides in its catalytic domain. *Chem. Biol.*, **19**, 572–578.

12 *Nucleic Acids Research*, 2013

21. Pradhan,S., Talbot,D., Sha,M., Benner,J., Hornstra,L., Li,E., Jaenisch,R. and Roberts,R.J. (1997) Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4666–4673.
22. Pradhan,S., Bacolla,A., Wells,R.D. and Roberts,R.J. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33002–33010.
23. Song,J., Rechko, O., Bestor,T.H. and Patel,D.J. (2011) Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science*, **331**, 1036–1040.
24. Gowher,H. and Jeltsch,A. (2001) Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J. Mol. Biol.*, **309**, 1201–1208.
25. Okano,M., Xie,S. and Li,E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.*, **19**, 219–220.
26. Fatemi,M., Hermann,A., Gowher,H. and Jeltsch,A. (2002) Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4981–4984.
27. Kim,G.D., Ni,J., Kelesoglu,N., Roberts,R.J. and Pradhan,S. (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.*, **21**, 4183–4195.
28. Walton,E.L., Francastel,C. and Velasco,G. (2011) Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics*, **6**, 1373–1377.
29. Xu,F., Mao,C., Ding,Y., Rui,C., Wu,L., Shi,A., Zhang,H., Zhang,L. and Xu,Z. (2010) Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr. Med. Chem.*, **17**, 4052–4071.
30. Arand,J., Spieler,D., Karius,T., Branco,M.R., Meilinger,D., Meissner,A., Jenuwein,T., Xu,G., Leonhardt,H., Wolf,V. *et al.* (2012) *In vivo* control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet.*, **8**, e1002750.
31. Chen,T., Ueda,Y., Dodge,J.E., Wang,Z. and Li,E. (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 5594–5605.
32. Dodge,J.E., Okano,M., Dick,F., Tsujimoto,N., Chen,T., Wang,S., Ueda,Y., Dyson,N. and Li,E. (2005) Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17986–17991.
33. Liang,G., Chan,M.F., Tomigahara,Y., Tsai,Y.C., Gonzales,F.A., Li,E., Laird,P.W. and Jones,P.A. (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 480–491.
34. Hemeon,I., Gutierrez,J.A., Ho,M.C. and Schramm,V.L. (2011) Characterizing DNA methyltransferases with an ultrasensitive luciferase-linked continuous assay. *Anal. Chem.*, **83**, 4996–5004.
35. Ibanez,G., McBean,J.L., Astudillo,Y.M. and Luo,M. (2010) An enzyme-coupled ultrasensitive luminescence assay for protein methyltransferases. *Anal. Biochem.*, **401**, 203–210.
36. Graves,T.L., Zhang,Y. and Scott,J.E. (2008) A universal competitive fluorescence polarization activity assay for S-adenosylmethionine utilizing methyltransferases. *Anal. Biochem.*, **373**, 296–306.
37. Ceccaldi,A., Rajavelu,A., Champion,C., Rampon,C., Jurkowska,R., Jankevicius,G., Senamaud-Beaufort,C., Ponger,L., Gagey,N., Ali,H.D. *et al.* (2011) C5-DNA methyltransferase inhibitors: from screening to effects on zebrafish embryo development. *Chembiochem*, **12**, 1337–1345.
38. Ceccaldi,A., Rajavelu,A., Ragozin,S., Senamaud-Beaufort,C., Bashtykov,P., Testa,N., Dali-Ali,H., Maulay-Bailly,C., Amand,S., Guianvarc'h,D. *et al.* (2013) Identification of novel inhibitors of DNA methylation by screening of a chemical library. *ACS Chem. Biol.*, **8**, 543–548.
39. Halby,L., Champion,C., Senamaud-Beaufort,C., Ajjan,S., Drujon,T., Rajavelu,A., Ceccaldi,A., Jurkowska,R., Lequin,O., Nelson,W.G. *et al.* (2012) Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide. *Chembiochem*, **13**, 157–165.
40. Rubin,R.A. and Modrich,P. (1977) EcoRI methylase. physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7265–7272.
41. Jeltsch,A., Friedrich,T. and Roth,M. (1998) Kinetics of methylation and binding of DNA by the EcoRV adenine-N6 methyltransferase. *J. Mol. Biol.*, **275**, 747–758.
42. Jia,D., Jurkowska,R.Z., Zhang,X., Jeltsch,A. and Cheng,X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, **449**, 248–251.
43. Lee,B.H., Yegnasubramanian,S., Lin,X. and Nelson,W.G. (2005) Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.*, **280**, 40749–40756.
44. Fritsch,L., Robin,P., Mathieu,J.R., Souidi,M., Hinaux,H., Rougeulle,C., Harel-Bellan,A., Ameyar-Zazoua,M. and Ait-Si-Ali,S. (2010) A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol. Cell*, **37**, 46–56.
45. Yokochi,T. and Robertson,K.D. (2004) Dimethyl sulfoxide stimulates the catalytic activity of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) *in vitro*. *Bioorg. Chem.*, **32**, 234–243.
46. Song,J., Teplova,M., Ishibe-Murakami,S. and Patel,D.J. (2012) Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science*, **335**, 709–712.
47. Copeland,R.A. (2003) Mechanistic considerations in high-throughput screening. *Anal. Biochem.*, **320**, 1–12.
48. Zhang,J.H., Chung,T.D. and Oldenburg,K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.*, **4**, 67–73.
49. Lin,Y., Fan,H., Frederiksen,M., Zhao,K., Jiang,L., Wang,Z., Zhou,S., Guo,W., Gao,J., Li,S. *et al.* (2012) Detecting S-adenosyl-L-methionine-induced conformational change of a histone methyltransferase using a homogeneous time-resolved fluorescence-based binding assay. *Anal. Biochem.*, **423**, 171–177.
50. Schluckebier,G., Kozak,M., Bleimling,N., Weinhold,E. and Saenger,W. (1997) Differential binding of S-adenosylmethionine S-adenosylhomocysteine and Sinefungin to the adenine-specific DNA methyltransferase M.TaqI. *J. Mol. Biol.*, **265**, 56–67.
51. Champion,C., Guianvarc'h,D., Senamaud-Beaufort,C., Jurkowska,R.Z., Jeltsch,A., Ponger,L., Arimondo,P.B. and Guicysse-Peugeot,A.L. (2010) Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One*, **5**, e12388.
52. Vedadi,M., Barsyte-Lovejoy,D., Liu,F., Rival-Gervier,S., Allali-Hassani,A., Labrie,V., Wigle,T.J., Dimaggio,P.A., Wasney,G.A., Siarheyeva,A. *et al.* (2011) A chemical probe selectively inhibits G9a and GLP methyltransferase activity in cells. *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 566–574.
53. Copeland,R.A. (2005) Reversible modes of inhibitor interactions with enzymes. In: *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 48–81.
54. Flynn,J. and Reich,N. (1998) Murine DNA (cytosine-5)-methyltransferase: steady-state and substrate trapping analyses of the kinetic mechanism. *Biochemistry*, **37**, 15162–15169.
55. Svedruzic,Z.M. and Reich,N.O. (2005) DNA cytosine C5 methyltransferase Dnmt1: catalysis-dependent release of allosteric inhibition. *Biochemistry*, **44**, 9472–9485.
56. Schnakenburger,M., Grandjette,C., Ghelfi,J., Karius,T., Foliguet,B., Dicato,M. and Diederich,M. (2011) Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy. *Biochem. Pharmacol.*, **81**, 364–378.
57. Tsai,H.C., Li,H., Van,N.L., Cai,Y., Robert,C., Rassool,F.V., Shin,J.J., Harbom,K.M., Beaty,R., Pappou,E. *et al.* (2012) Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell*, **21**, 430–446.

Annexe A.2.

Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino-N-(4-aminophenyl)benzamide Analogues of Quinoline-Based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation.

(2014) *ChemMedChem*, 9 (3), 590-601.

Rilova, E., Erdmann, A., Gros, C., Masson, V., Aussagues, Y., Poughon-Cassabois, V., Rajavelu, A., Jeltsch, A., Menon, Y., Novosad, N., Grégoire, J.-M., Vispé, S., Schambel, P., Ausseil, F., Sautel, F., Arimondo, P.B. and Cantagrel, F.

Résumé de l'article

Cet article présente une étude réalisée sur 38 dérivés synthétisés dans notre équipe comme des analogues de la molécule SGI-1027.

Initialement synthétisé en tant que ligand du petit sillon, le SGI-1027 inhibe la DNMT bactérienne M.SssI, la DNMT1 humaine et la Dnmt3A et Dnmt3B murines (Datta *et al.* 2009). Ce composé est en outre, capable d'inhiber la méthylation de l'ADN au niveau cellulaire et de réactiver les gènes suppresseurs de tumeurs *P16*, *TIMP3* et *MLH1* (Datta *et al.*, 2009). Cette molécule est également utilisée comme composé de référence dans de nombreux tests d'inhibition des DNMT (Yoo and Medina-Franco 2012 ; Fagan *et al.* 2013) et sert de base à plusieurs études de SAR (Gamage *et al.* 2013; Valente *et al.*, 2014).

La synthèse de nouveaux dérivés de SGI-1027 a donc été envisagée dans notre laboratoire afin d'accroître sa puissance. Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence la réactivation du gène de la luciférase, dans le modèle cellulaire KG-1-CMV Luc, pour 3 dérivés présentant une inhibition *in vitro* de DNMT 3A comparable au SGI-1027.

DOI: 10.1002/cmdc.201300420

Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino-N-(4-aminophenyl)benzamide Analogues of Quinoline-Based SGI-1027 as Inhibitors of DNA Methylation

Elodie Rilova,^[a] Alexandre Erdmann,^[a] Christina Gros,^[a] Véronique Masson,^[a] Yannick Aussagues,^[a] Valérie Poughon-Cassabois,^[a] Arumugam Rajavelu,^[b] Albert Jeltsch,^[b] Yoann Menon,^[a] Natacha Novosad,^[a] Jean-Marc Gregoire,^[a] Stéphane Vispé,^[a] Philippe Schambel,^[c] Frédéric Ausseil,^[a] François Sautel,^[a] Paola B. Arimondo,^{*,[a]} and Frédéric Cantagrel^{*,[a]}

Dedicated to the memory of M. Pierre Fabre (1926–2013), founder of the Pierre Fabre Laboratories and a visionary pharmacist

Quinoline derivative SGI-1027 (N-(4-(2-amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl)-4-(quinolin-4-ylamino)benzamide) was first described in 2009 as a potent inhibitor of DNA methyltransferase (DNMT) 1, 3A and 3B. Based on molecular modeling studies, performed using the crystal structure of *Haemophilus haemolyticus* cytosine-5 DNA methyltransferase (Mhha1 C5 DNMT), which suggested that the quinoline and the aminopyrimidine moieties of SGI-1027 are important for interaction with the substrates and protein, we designed and synthesized 25 derivatives. Among them, four compounds—namely the derivatives **12**, **16**, **31** and **32**—exhibited activities comparable to that of the parent compound. Further evaluation revealed that these compounds were more potent against human DNMT3A than against human DNMT1 and induced the re-expression of a reporter gene, controlled by a methylated cytomegalovirus (CMV) promoter, in leukemia KG-1 cells. These compounds pos-

sessed cytotoxicity against leukemia KG-1 cells in the micromolar range, comparable with the cytotoxicity of the reference compound, SGI-1027. Structure–activity relationships were elucidated from the results. First, the presence of a methylene or carbonyl group to conjugate the quinoline moiety decreased the activity. Second, the size and nature of the aromatic or heterocycle substituents effects inhibition activity: tricyclic moieties, such as acridine, were found to decrease activity, while bicyclic substituents, such as quinoline, were well tolerated. The best combination was found to be a bicyclic substituent on one side of the compound, and a one-ring moiety on the other side. Finally, the orientation of the central amide bond was found to have little effect on the biological activity. This study provides new insights in to the structure–activity relationships of SGI-1027 and its derivative.

Introduction

DNA methylation is an epigenetic modification that is involved in the control of gene expression.^[1] It plays an important role in tumorigenesis and tumor maintenance.^[2] Concomitantly to a global hypomethylation contributing to genetic instability, promoter hypermethylation of tumor suppressor genes is com-

monly observed in cancers, such that it can be used as a biomarker.^[3] As with the other epigenetic marks, DNA methylation is reversible and constitutes a promising target in cancer treatment. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMT), which transfer the methyl group from the cofactor, S-adenosyl-L-methionine (AdoMet), to the position 5 of the deoxycytidine in a CpG context.^[4] Two nucleosides analogues of cytidine, 5-azacytidine **2** (Saza) and 5-azadeoxycytidine **3** (SazadC), have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML).^[5]

Beside nucleoside inhibitors, many efforts are made to develop new non-nucleoside inhibitors to overcome the limits of these azanucleosides, such as chemical instability and incorporation into DNA for activity.^[6] In 2009, Datta et al. published a quinolone derivative, SGI-1027 (**1**), that depletes DNMT1.^[7] Interestingly, its bisquaternary salt was first described for its anti-leukemic activity.^[8] Inhibitory activity of SGI-1027 was described against DNMT1, 3A and 3B^[7]. The compound was shown to degrade the enzymes, inhibit DNA methylation in

[a] E. Rilova, A. Erdmann, C. Gros, V. Masson, Y. Aussagues, V. Poughon-Cassabois, Y. Menon, N. Novosad, Dr. J.-M. Gregoire, Dr. S. Vispé, Dr. F. Ausseil, F. Sautel, Dr. P. B. Arimondo, Dr. F. Cantagrel
USR CNRS-Pierre Fabre No. 3388 ETaC
Centre de Recherche et de Développement Pierre Fabre (CRDPF)
3 Ave Hubert Curien, 31035 Toulouse Cedex 01 (France)
E-mail: paola.arimondo@etac.cnrs.fr
frederic.cantagrel@etac.cnrs.fr

[b] A. Rajavelu, Prof. A. Jeltsch
Institute of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University Stuttgart
Pfaffenwaldring 55, 70569 Stuttgart (Germany)

[c] P. Schambel
Institut de Recherches Pierre Fabre
17 Rue Jean Moulin, 81106 Castres Cedex (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201300420>.

colon cancer cell lines, and reactivate *P16*, *MLH1* and *TIMP3* genes.

Here, we describe the conception of new derivatives of SGI-1027 guided by a molecular modeling study. A total of 25 derivatives were synthesized and screened for their ability to inhibit the catalytic domain of human DNMT3A. Selectivity against several methyltransferases was assessed for the most potent inhibitors, as was their ability to reactivate gene expression in an epigenetic reporter system in a leukemia cell line.

Results and Discussion

Docking

To design new analogues of SGI-1027 and test their activity against the catalytic domain of hDNMT3A, we started by carrying out a docking study of SGI-1027 in the catalytic pocket of DNMTs. Recently, the crystal structure of the murine catalytic complex Dnmt3A/3L (PDB: 2QRV^[9]) and several crystal structures of DNMT1 have been published (PDB: 3PTA,^[10] 3OS5, 4DA4^[11] and 3PT6^[10]), together with molecular docking and pharmacophore modelling studies based on these structures.^[12–14] Concerning the DNMT1 structures, we chose not to use them since the N-terminal domain of the C5 DNA methyltransferases is not well conserved and, in particular, DNMT1 contains an autoinhibition linker that is lacking in the DNMT3 isoforms^[10,11, 15] conferring very specific properties to the interaction with the substrates and affecting inhibition, as observed for SGI-1027.^[13,14] Concerning the murine Dnmt3A catalytic domain co-crystallized with C-terminal Dnmt3L (PDB: 2QRV^[9]), the substrate cytosine is not resolved in the crystal structure, only the cofactor (here the product S-adenosyl-L-homocysteine, AdoHcy). Interestingly, the DNMT3A catalytic pocket is well superimposable with that of the crystal structure of the bacterial *Haemophilus haemolyticus* cytosine-5 DNA methyltransferase (MHhal C5 DNMT; PDB: 2HR1)^[16] in particular for the AdoHcy molecule (shown in Figure S1 in the Supporting Information). We chose to conduct our docking studies on bacterial MHhal C5 DNMT, since the catalytic pocket is well conserved among the C5 DNMTs and in the crystal structure of MHhal C5 DNMT, both the co-factor (here the product AdoHcy) and the DNA substrate (deoxycytidine) are well resolved. Schematically, the catalytic pocket of the C5 DNA methyltransferases can be considered formed of three binding pockets (Figure 1): one pocket accommodates the adenine of AdoMet, another accommodates the amino acid of

AdoMet, and the other accommodates the cytidine of the DNA that is flipped out of the DNA double helix into the catalytic pocket of the enzyme. Our docking studies of SGI-1027 (1) in MHhal C5 DNMT (Figure 1) showed that the compound fits within the adenine binding pocket of the cofactor through the aminopyrimidine group (part C of SGI-1027) and within the cytidine binding pocket through the quinoline moiety (part A of SGI-1027). In our model, the orientation of the molecule seems to forbid any interaction with the amino acid binding pocket.

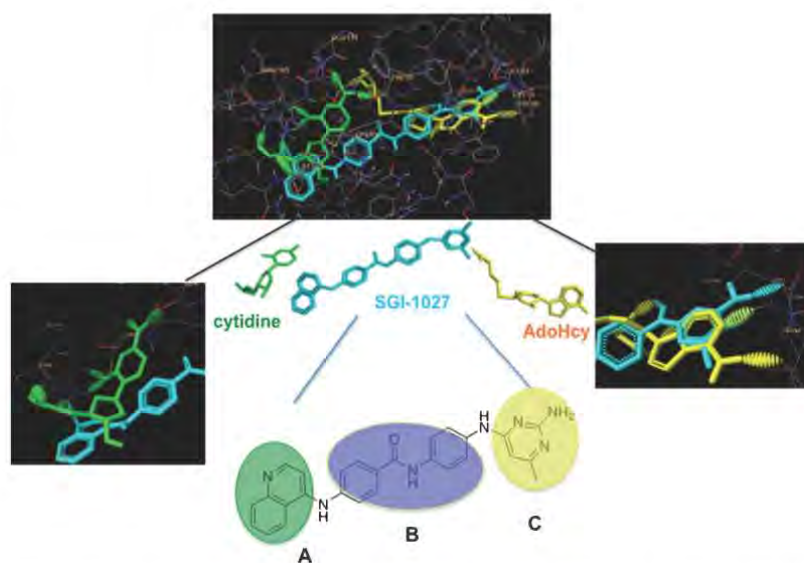


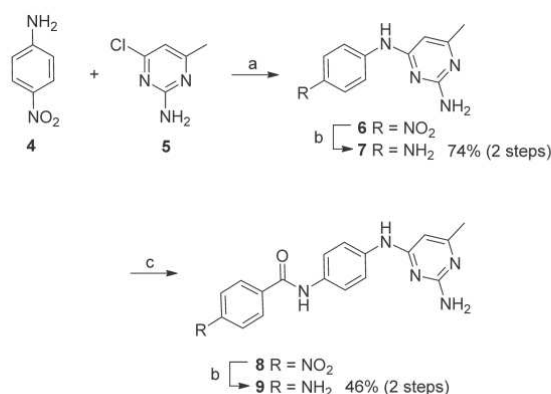
Figure 1. SGI-1027 molecular docking in *Haemophilus haemolyticus* cytosine-5 DNA methyltransferase (MHhal C5 DNMT; PDB: 2HR1^[16]). The co-crystallized S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) product of the methylation reaction is depicted in yellow and the cytidine substrate in green. The docked SGI-1027 is in cyan. The three parts of the molecule (A, B and C) explored here are encircled in colors in the zoom of SGI-1027.

Noteworthy, the finding that part C fits into the adenine pocket of the cofactor is in agreement with the results obtained by induced-fit docking of SGI-1027 in the MTase domain of mDnmt3A,^[14] even though part A is differently positioned compared with our docking result. In particular, the pyrimidine moiety (C) of SGI-1027 was found well superimposable to the six-membered ring of the adenine of AdoHcy (Figure 1, right-hand zoom). In addition, the amino group on the C4 of the adenine of AdoHcy formed hydrogen bonds with the carboxylic residue of Asp60 (corresponding to Asp682 in DNMT3A), and in parallel, the amino group of the pyrimidyl moiety of the inhibitor interacted with the amide residue of Asn39 (corresponding to Ser659 in DNMT3A). On the contrary, little interactions with the quinoline moiety A were observed in the cytosine pocket, except for some superimposition with the ribose of the cytidine. This can explain the differences observed for part A between our model and the induced-fit docking model of SGI-1027 in mDnmt3A described by Yoo et al.,^[14] who used a crystal structure lacking the cytidine substrate in the resolution. Still, we found an interaction of part A with the enzyme,

with Arg 165 (corresponding to Arg 788 in DNMT3A) (Figure 1, left-hand zoom). Based on these findings, we designed new derivatives of SGI-1027 to explore the substrate binding pockets guided by our docking model. More specifically, since few interactions were modeled for the quinoline moiety (part A, Figure 1), we began by modifying this part of the molecule aiming at improving the affinity of the compounds for the deoxycytidine binding pocket of DNMTs.

Exploring the deoxycytidine pocket

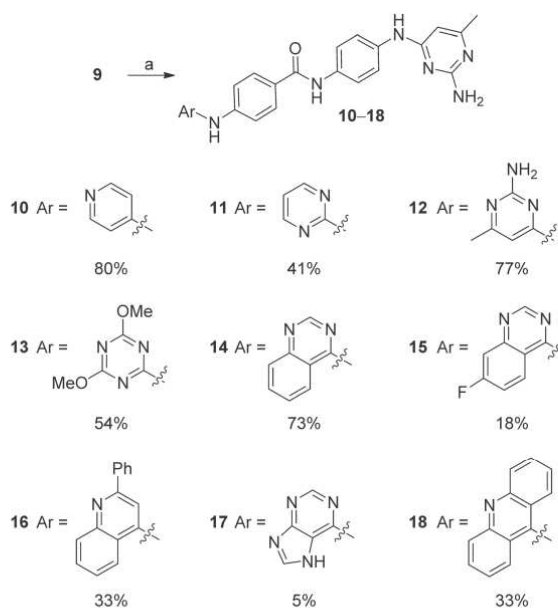
According to the above molecular docking studies, the quinoline moiety (Figure 1, ring A) is superimposable on the flipped-out deoxycytidine but lacks strong interactions in the pocket. Thus, its modifications can improve the affinity for the cytidine binding pocket. In a first series of compounds, this substituent was replaced with aromatic and heteroaromatic rings. The synthesis of compound **9** followed a published route (Scheme 1).^[17] The desired derivatives were then obtained by direct reaction with miscellaneous aryl chlorides in the presence of catalytic amounts of acid (Scheme 2).



Scheme 1. Synthesis of compound **9**. Reagents and conditions: a) HCl, ethoxyethanol, reflux, 3 h; b) Fe, AcOH, EtOH/H₂O (2:1), reflux, 15 h; c) 4-nitrobenzoyl chloride, Et₃N, dioxane, 60 °C, 1 h.

Yields were generally good, except upon use of chloropurine, because of its poor reactivity and the poor solubility of the final product (**17**) giving rise to material loss during purification. 4-Chloro-7-fluoroquinazoline—used to obtain **15**—was synthesized by reaction of *N,N*-dimethylformamide with 4-fluoro-2-aminobenzoic acid followed by intramolecular cyclization and chlorination with thionyl chloride.^[18]

The compounds were assayed for their ability to inhibit the catalytic activity of human DNMT3A at 32 and 10 μM (Table 1), with parent compound SGI-1027 as a reference. Compound **10**, where a pyridine replaces the quinoline of SGI-1027, inhibited 91% of the enzyme activity at 32 μM, but this inhibition dramatically dropped at 10 μM (EC₅₀ value of 13 μM ± 1 was calculated). Compounds **11** and **12**, bearing an unsubstituted



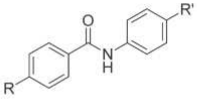
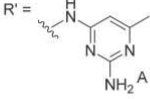
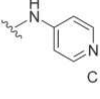
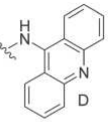
Scheme 2. Synthesis of aryl derivatives. Reagents and conditions: a) ArCl, HCl (cat.), MeOH/H₂O/EtOH (1:1:1), reflux, 22 h.

pyrimidine and methylated aminopyrimidine, respectively, were slightly less active. Dimethoxy triazine **13** lost most of the inhibitory activity. In agreement with our model, the replacement of the quinoline moiety by bicyclic or tricyclic moieties was in general detrimental on the inhibition activity compared with the monocyclic substitution (**14–18**; Figure 2). In fact, the introduction of an adenine as ring A induced a strong decrease in the activity (analogue **17**), comforting the hypothesis that ring A resides in the cytidine pocket and not in the AdoMet pocket. In contrast, the addition of a phenyl group on the quinoline, analogue **16**, kept the activity at a good level, suggesting the presence of a hydrophobic pocket that might be worth exploring in future optimizations.

In a second series of derivatives, we studied the influence of the distance between rings A and B on the activity of the compounds. Preparation of compounds comprising an intercalated carbonyl group was easily achieved by acylation, albeit with only moderate yields (**19–22**; Scheme 3). Not only was the linker length changed in these compounds but also π -stacking interactions and hydrogen bond counts were modified.

Next, methylene groups were introduced. In the absence of a reaction with the corresponding chloromethylpyridines, methylene group introduction was performed by reductive amination (derivatives **23** and **24**; Scheme 4). Preparation of pyridine-3- or -4-carboxaldehyde from the corresponding alcohols could be done either with pyridinium chromate or manganese dioxide, but the latter was preferred because traces of oxidants led to formation of unexpected compound **25** that was used as a control (presumably via formaldehyde formation). All these modifications led to complete loss of activity (compounds **19–25**; Figure 2 and Table 1).

Table 1. Screening results for all compounds against DNMT3A catalytic activity.

									
Compd	R	R'	Inhibition [%] ^[a]		Compd	R	R'	Inhibition [%] ^[a]	
			32 μ M	10 μ M				32 μ M	10 μ M
SGI-1027 (1)		A	76 \pm 5	74 \pm 5	20		A	0 ^[b]	0
8		A	1 ^[b]	n.d.	21		A	0 ^[b]	0
9		A	0 ^[b]	n.d.	22		A	8	29
10		A	91 \pm 4	32	23		A	0 ^[b]	0
11		A	65 \pm 3	17	24		A	0 ^[b]	0
12		A	69 \pm 1	82 \pm 1	25		A	4	0
13		A	35	36	30		B	47 \pm 1	56 \pm 11
14		A	19	25	31		B	75 \pm 8	73 \pm 3
15		A	6	19	32		B	53 \pm 13	53 \pm 8
16		A	55 \pm 10	81 \pm 5	33		B	46	29
17		A	3 ^[b]	8	36		C	54 \pm 5	18
18		A	53 \pm 2	11	37		B	29	39
19		A	0 ^[b]	5	38		D	62 \pm 22	48 \pm 8

[a] When inhibition was > 50%, experiments were performed in triplicate/duplicate, and these data are reported as the mean \pm SEM. All other values are single determinations. Not determined (n.d.). [b] Inhibition was measured at 20 μ M.

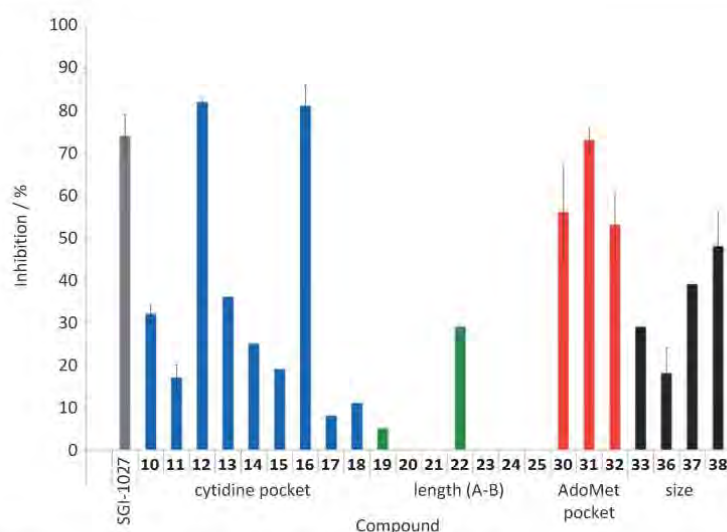
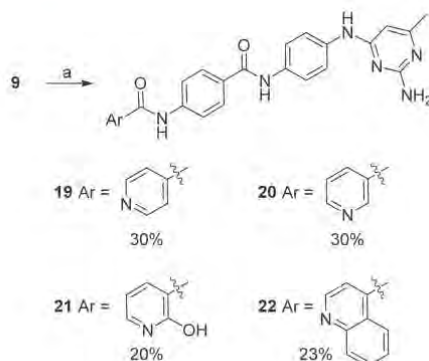
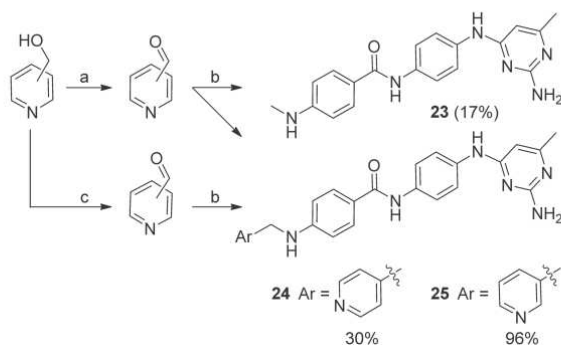


Figure 2. Inhibition of DNMT3A by parent compound SGI-1027 (■) and synthesized compounds exploring the deoxycytidine pocket (■), with varying tether length between the quinoline A and part B (■), addressing the AdoMet pocket (■), and with different moiety sizes addressing the two substrates pockets (■). Percent inhibition was determined at a concentration of 10 μM .



Scheme 3. Synthesis of acyl derivatives. *Reagents and conditions:* a) Ar-C(O)-Cl, pyr., 0 °C \rightarrow RT, o/n.



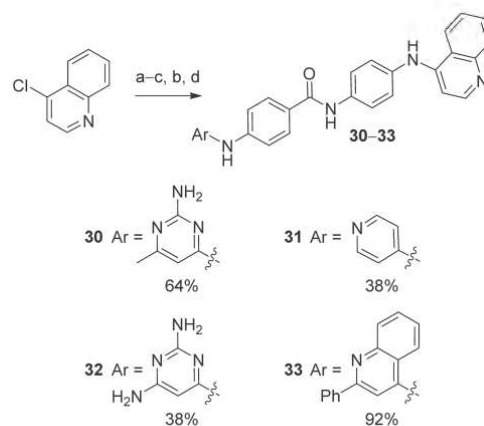
Scheme 4. Synthesis of methylene derivatives. *Reagents and conditions:* a) PCC, CH_2Cl_2 , RT, 90 min; b) 1. 9, MeOH, Et₃N, RT, 3.5 h; 2. AcOH, NaBH₃CN, RT, o/n; c) MnO₂, CH_2Cl_2 , RT, o/n.

Exploring the AdoMet pocket

A third series of products was devised to investigate the importance of the aminopyrimidine moiety (ring C in Figure 1). The synthetic pathway was similar to the one described above, but used 4-chloroquinoline instead of the chloropyrimidine as the starting materials.

After coupling with 4-nitro-aniline, the resulting nitro compound (26) was reduced to amino derivative 27 with iron in acetic acid. Amidation with 4-nitro-benzoyl chloride yielded nitro compound 28, which was similarly reduced to amine 29. As before, compounds 30–33 were prepared by reaction of the corresponding aryl chloride in the presence of a catalytic amount of hydrochloride acid (Scheme 5). Compound 30 is an

isomer of SGI-1027 with inversion of the central amide bond of part B. This compound was recently described by Gamage et al. and showed lower efficiency on DNMT1 degradation than SGI-1027.^[19] In agreement with these previous findings on DNMT1,^[17,19] methyl-amino pyrimidine 30 was found to be less potent than SGI-1027 against DNMT3A, and its level of activity was comparable to that of diaminopyrimidine 32 (Figure 2 and Table 1). Unexpectedly, compound 32 was difficult to analyze because it did not present a dose-response curve but rather a plateau at 50% inhibition between 32 and 1 μM (data not shown). This could be due to chemical-physical features of the



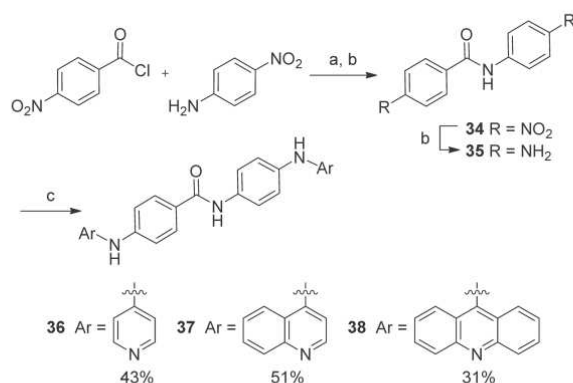
Scheme 5. Synthesis of quinoline derivatives. *Reagents and conditions:* a) 4-nitroaniline, HCl (cat), ethoxyethanol, reflux, 3 h; b) Fe, AcOH, EtOH/H₂O (2:1), reflux, 15 h; c) 4-nitrobenzoyl chloride, Et₃N, dioxane, 60 °C, 1 h; d) ArCl, HCl (cat), EtOH/H₂O/MeOH (1:1:1), reflux, o/n.

compound that we did not investigate further. Interestingly, compound **31**, containing the quinoline in C and a simplified pyridine cycle in A, was the most potent compound at both 32 and 10 μM , with similar potency than SGI-1027 (Table 1).

Probing the size of cofactor and substrate pockets

Finally, in order to investigate the size of the cofactor and substrate pockets, we introduced variations to parts A and C, exploring the effect of terminating the molecule with a single ring on both ends (product **36**), with a bicycle (derivatives **33** and **37**) or a tricyclic system (Scheme 5).

Symmetrical compound **36**, terminated with a pyridine moiety, was synthesized according to a simplified synthetic scheme. The central amide part B was easily prepared by reaction between 4-nitrobenzoyl chloride and nitroaniline, followed by simultaneous reduction of the nitro groups to afford compound **35** (Scheme 6). A double arylation with 4-chloropyridine led to **36** in three steps. This simplified pathway offered bis-quinoline **37** (2+2 combination) and bis-acridine **38** (3+3 combination) derivatives.



Scheme 6. Synthesis of symmetrical compounds. *Reagents and conditions:* a) Et_3N , dioxane, 60 $^\circ\text{C}$, 1 h; b) Fe, AcOH, EtOH/ H_2O (2:1), reflux, 15 h; c) ArCl, HCl (cat), EtOH/ H_2O /MeOH (1:1:1), reflux, o/n.

The inhibitory activity against DNMT3A at 32 and 10 μM confirmed that the best inhibitors remain derivative **31** terminated by a single ring on one side and a two-ring system on the other (Figure 2 and Table 1).

Biological activities

The most active compounds against DNMT3A, **12**, **16** and **31** and inactive compound **19** (Figure 2) were further assayed to determine the concentration at which 50% of efficacy of inhibition is obtained (EC_{50}) (Figure 3 and Table 2). We did not further investigate active compound **32** because of its behavior in the dose–response experiment discussed above. Compound **31**, the most potent and efficient on hDNMT3A inhibition (EC_{50} = 0.9 μM , efficacy 90%), was tested on DNMT1 and on histone lysine methyltransferases G9a inhibition for selectivity.

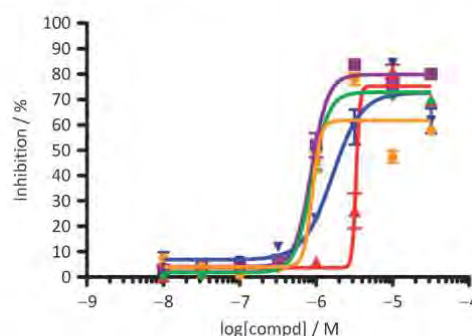


Figure 3. hDNMT3A inhibition curves for SGI-1027 (\blacksquare), and compounds **12** (\blacktriangle), **16** (\blacktriangledown), **31** (\blacklozenge) and **32** (\bullet). Data are the mean of triplicate determinations.

The compound gave an EC_{50} value of $15 \pm 3 \mu\text{M}$ against hDNMT1, comparable to SGI-1027 with an EC_{50} value of $10 \pm 1 \mu\text{M}$, and a weak inhibition activity on G9a with an IC_{50} value of $28 \pm 4 \mu\text{M}$, comparable to that of SGI-1027 (IC_{50} = $59 \pm 4 \mu\text{M}$).

The compounds were tested for their ability to reactivate gene expression by use of an integrated luciferase reporter system under the control of a methylated cytomegalovirus (CMV) promoter in leukemia KG-1 cells (CMV-luc assay reported in Table 2), which inhibits its expression. In parallel, the antiproliferative activity of the compounds was tested in KG-1 leukemia cells. In particular, the cytotoxicity in the KG-1 cells of the compounds can interfere with the CMV-luc assay.

The fold induction of the luciferase signal was measured in cells incubated for 24 hours in the presence of the test compounds at the indicated concentrations and normalized to the untreated control cells. Negative control compound **19**, which did not inhibit the enzyme, was also unable to reactivate luciferase expression. Parent compound SGI-1027 gave a 16-fold induction at 5 μM , but at 10 μM , a decrease in the luciferase signal was observed because of its cytotoxicity in the KG-1 cell line (EC_{50} = 4.4 μM ; Table 2). The most potent inhibitor of our series, compound **31**, reactivated luciferase expression starting from 1 μM ; however, cytotoxicity in the KG-1 cell line (EC_{50} = 1 μM ; Table 2) hindered the measurement of the luciferase signal at higher concentrations. Active bismonocyclic **12** gave an 8.6-fold induction at 10 μM , a dose that did not affect cell proliferation (Table 2). Compound **16** presented a similar activity profile as compound **31**. Even if the cytotoxicity clearly interfered with the measurement of luciferase induction, we can conclude that all inhibitors induced re-expression of the luciferase gene.

Conclusions

Three new derivatives of SGI-1027, compounds **12**, **16** and **31**, showed similar DNMT inhibition activity and gene expression induction as the parent compound, associated with proliferation inhibition on KG-1 cells in the micromolar range. Structure–activity relationship studies carried out on three parts of

Table 2. Biochemical and biological activity of the most active derivatives. Inhibition (EC_{50}) of human DNMT3A catalytic activity, cytotoxicity (EC_{50}) against leukemia KG-1 cells, and reactivation of luciferase expression of the CMV-luc construct in KG-1 cells.

Compd	EC_{50} [μ M]		Fold reactivation ^[c]						
	hDNMT3A ^[a]	KG-1 ^[b]	10 μ M	5 μ M	3.2 μ M	1 μ M	0.5 μ M	0.32 μ M	0.1 μ M
SGI-1027 (1)	0.9 (0.7–1.0)	4.4 (3.2–6.2)	7.6 \pm 1.3	15.7 \pm 0.2	7.1 \pm 1.2	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
12	5.0 (1.9–13)	> 10	8.6 \pm 0.9	2.6 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
16	1.6 (1.0–2.5)	1.3 (1.0–3.2)	6.1 \pm 2.7	6.0 \pm 2.0	5.5 \pm 1.3	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	n.d.	1.0 \pm 0.1
19	inactive	1.3 (0.9–1.7)	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
31	0.9 (0.7–1.0)	0.96 (0.9–1.0)	3.2 \pm 0.5	3.9 \pm 0.1	3.9 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	1.6 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1

[a] Concentration at which 50% inhibition of enzyme activity was observed; data represent the mean of 3–5 experiments; 95% confidence intervals are given in parentheses. [b] Concentration at which 50% inhibition of cellular proliferation was observed; data represent the mean of 3–5 experiments; 95% confidence intervals are given in parentheses. [c] Fold-induction (reactivation) of the luciferase gene controlled by methylated CMV compared with untreated cells after 24 h of treatment. Data represent the mean \pm SEM of 2–3 experiments.

the molecule indicated that the presence of a methylene or carbonyl group as a linker to the quinoline moiety dramatically decreased activity. Second, the effect of the size and nature of the aromatic or heterocycle substituents at the ends of the molecule played an important effect on inhibition: three-ring structures decreased the activity, while two-ring substituents were well tolerated, the best being the combination of a two-ring on one side and a one-ring system on the other. Finally the orientation of the central amide bond was found to have little effect on the activity. These findings bring new insights into the substituents that contribute to the DNMT inhibition activity of this family of compounds for further design of new more potent inhibitors.

Experimental Section

Chemistry

Reagents, chemicals and anhydrous solvents were purchased from commercial suppliers and used without purification. Sensitive reactions were performed under an argon atmosphere. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II spectrometer equipped with a ^{13}C cryoprobe at 500 MHz for ^1H and 126 MHz for ^{13}C ; 2D experiments were performed using standard Bruker programs. High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed on a Bruker MicroTOF spectrometer using electrospray ionization (ESI). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on precoated silica gel 60F₂₅₄ TLC plates (Merck), and spots were visualized by heating after dipping in KMnO_4 solution. Column chromatography was carried out on a Puriflash 430 apparatus (Interchim) equipped with 30 μm porated silica column.

Analytical HPLC was performed on a VWR-Hitachi apparatus ELITE LACHROM. A prepacked C_{18} reverse-phase column (Waters X-Bridge RP-18, 4.6 \times 100 mm, 5 μm) was used for analytical HPLC with a binary gradient elution (solvent A: H_2O ; solvent B: MeCN) and a flow rate of 1 mL min^{-1} . Preparative HPLC was performed on an apparatus equipped with a VWR International LaPrep pump P110, a VWR LaPrep P314 dual λ absorbance detector, and EZ-Chrom software. A Waters Xbridge RP-18 column (19 \times 250 mm, 10 μm) was used for preparative HPLC with a binary gradient elution (solvent A: H_2O ; solvent B: CH_3CN) and a flow rate of 25 mL min^{-1} , and the UV absorbance was monitored at 250 and 320 nm.

***N*⁴-(4-Nitrophenyl)-6-methylpyrimidine-2,4-diamine (6):** 4-Nitroaniline **4** (6.00 g, 43.44 mmol) and 2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine **5** (6.24 g, 43.44 mmol) were dissolved in 2-ethoxyethanol (330 mL). A few drops of HCl (35%) were added, and the solution was heated at reflux for 3 h, and then allowed to cool to RT overnight. The reaction mixture was filtered, and the resulting solid was rinsed with Et_2O and dried in vacuo to afford compound **6** as a pale yellow solid (8.53 g, 80%): ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 2.22 (s, 3H), 6.04 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.18 ppm (d, J = 9.4 Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD): δ = 23.3, 97.8, 119.6, 125.8, 148.4, 162.9, 167.3 ppm; MS (ESI): m/z = 246 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

***N*⁴-(4-Aminophenyl)-6-methylpyrimidine-2,4-diamine (7):** A refluxing suspension of amine **6** (7.08 g, 28.9 mmol) in $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (86 mL/43 mL) was treated with Fe powder (6.44 g, 115.5 mmol) and AcOH (2.6 mL). The resulting dark brown suspension was heated at reflux for 15 h, after which time, the hot mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated in vacuo and purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 80:20) to afford amine **7** as a brown solid (5.71 g, 92%): ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 2.13 (s, 3H), 5.82 (s, 1H), 6.73 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.17 ppm (d, J = 8.6 Hz, 2H); MS (ESI): m/z = 216 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-nitrobenzamide (8):** 4-Nitrobenzoyl chloride (1.21 g, 6.5 mmol) and Et_3N (0.99 g, 9.8 mmol) were sequentially added to a solution of amine **7** (1.40 g, 6.5 mmol) in dry dioxane (90 mL). The solution was heated at 60 $^\circ\text{C}$ for 1 h, and the reaction mixture was then allowed to cool to RT. Solvent was removed in vacuo, and the residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 70:30) to give compound **8** (1.63 g, 70%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.08 (s, 3H), 5.86 (s, 1H), 6.13 (s, 2H), 7.66–7.73 (m, 4H), 8.18 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.37 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.99 (s, 1H), 10.47 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 23.5, 94.7, 119.5, 121.0, 123.6, 129.2, 132.5, 132.5, 137.3, 140.8, 149.1, 161.3, 162.9, 163.4, 165.0 ppm; MS (ESI): m/z = 365 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-aminobenzamide (9):** A refluxing suspension of **8** (1.07 g, 2.9 mmol) in $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (13 mL/6.5 mL) was treated with Fe powder (654 mg, 11.7 mmol) and AcOH (1.3 mL). The resulting dark brown suspension was heated at reflux for 15 h, after which time, the resulting mixture was filtered through a pad of silica using 7N NH_3 in MeOH . Solvent was removed in vacuo and purification by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 70:30) afforded amine **9** as a brown solid (638 mg, 65%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.07 (s, 3H), 5.73 (s, 2H), 5.84 (s, 1H), 6.09 (s, 2H), 6.59 (d, J =

8.6 Hz, 2H), 7.59–7.63 (m, 4H), 7.69 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 8.89 (s, 1H), 9.67 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.5$, 94.7, 112.7, 119.9, 120.8, 121.4, 129.4, 133.8, 136.1, 152.0, 161.5, 163.2, 165.1 ppm; MS (ESI): $m/z=335$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(pyridin-4-ylamino)benzamide (10):** A refluxing suspension of amine **9** (100 mg, 0.3 mmol) in MeOH/ H_2O /EtOH (2 mL/2 mL/2 mL) was treated with chloropyridine hydrochloride (34 mg, 0.3 mmol) and one drop of HCl (35%). The resulting yellow solution was heated at reflux for 22 h, and then was cooled to RT and concentrated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0→70:30) gave compound **10** as a yellow solid (98 mg, 80%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.28$ (s, 3H), 6.18 (s, 1H), 7.29 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.78–7.83 (m, 4H), 8.10 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 8.36 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 10.40 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 11.01 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=18.4$, 97.4, 109.5, 120.9, 121.7, 122.0, 129.5, 131.8, 134.0, 135.8, 140.4, 141.0, 152.3, 155.6, 155.7, 161.4, 164.6 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}$: 412.1886, found: 412.1873.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)-phenyl]-4-(pyrimidin-2-ylamino)benzamide (11):** Compound **11** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (40 mg, 0.12 mmol) and 2-chloropyrimidine (14 mg, 0.12 mmol). Purification by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10→0:100) gave compound **11** as a yellow solid (20 mg, 41%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.11 (br s, 2H), 6.93 (t, $J=4.8$ Hz, 1H), 7.65 (s, 4H), 7.91 (s, 4H), 8.55 (d, $J=4.7$ Hz, 2H), 8.94 (s, 1H), 9.98 ppm (d, $J=9.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.9$, 95.0, 113.6, 118.0, 120.1, 121.3, 127.7, 128.8, 133.7, 136.9, 143.9, 158.6, 160.1, 161.8, 163.3, 165.2, 165.3 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}$: 413.1838, found: 413.1825.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-*N*-4-(2-amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)benzamide (12):** Compound **12** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (40 mg, 0.12 mmol) and 2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine (17 mg, 0.12 mmol). Concentration in vacuo gave compound **12** as a yellow amorphous solid (40 mg, 77%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 5.87 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 6.10 (brs, 2H), 6.26 (brs, 2H), 7.66 (s, 4H), 7.90 (s, 4H), 9.00 (brs, 1H), 9.46 (brs, 1H), 10.00 ppm (brs, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.5$, 23.6, 94.6, 95.5, 117.9, 119.6, 120.8, 126.9, 128.4, 133.3, 136.5, 144.1, 161.2, 161.4, 162.9, 162.9, 164.7, 164.9, 165.5 ppm. Filtration of a DMSO solution of **12** through a pad of K_2CO_3 gave the free base of **12** as a pale yellow solid quantitatively: ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.11 (br s, 2H), 6.93 (t, $J=4.8$ Hz, 1H), 7.65 (s, 4H), 7.91 (s, 4H), 8.55 (d, $J=4.7$ Hz, 2H), 8.94 (s, 1H), 9.98 ppm (d, $J=9.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.9$, 95.0, 113.6, 118.0, 120.1, 121.3, 127.7, 128.8, 133.7, 136.9, 143.9, 158.6, 160.1, 161.8, 163.3, 165.2, 165.3 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}$: 413.1838, found: 413.1825.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-ylamino)benzamide (13):** Compound **13** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (40 mg, 0.12 mmol) and 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (21 mg, 0.12 mmol). Purification by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10→0:100) gave compound **13** as a white solid (30 mg, 54%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=10.41$ (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.94 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.65 (s, 4H), 6.11 (br s, 2H), 5.85 (s, 1H), 3.94 (s, 6H), 2.07 ppm (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.5$, 54.7, 94.6, 119.4, 119.6,

120.8, 128.4, 129.0, 133.1, 136.6, 141.9, 161.4, 162.9, 164.6, 164.9, 166.0, 172.0 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_3$: 474.2002, found: 474.1996.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(quinazolin-4-ylamino)benzamide (14):** Compound **14** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (30 mg, 0.09 mmol) and 4-chloroquinazoline (15 mg, 0.09 mmol). Purification by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10→0:100) gave compound **14** as a white solid (25 mg, 73%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.13 (br s, 1H), 7.67–7.72 (m, 4H), 7.83 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.90 (td, $J=7.1$, 1.3 Hz, 1H), 8.00 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.61 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 10.03 (br s, 1H), 10.10 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.6$, 94.6, 115.4, 119.7, 120.9, 121.2, 123.1, 126.6, 128.0, 128.2, 129.6, 133.2, 133.3, 136.7, 142.4, 149.8, 154.4, 157.6, 161.4, 163.0, 164.7, 165.0 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}$: 463.1995, found: 463.1970.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(7-fluoroquinazolin-4-ylamino)benzamide (15):** Compound **15** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (50 mg, 0.15 mmol) and 4-chloro-7-fluoroquinazoline (25 mg, 0.15 mmol). Purification by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10→0:100) gave compound **15** as a white solid (12 mg, 18%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.13 (s, 2H), 7.58–7.62 (m, 2H), 7.67 (s, 4H), 8.03 (d, $J=15.5$ Hz, 4H), 8.68–8.72 (m, 2H), 8.96 (s, 1H), 10.11 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=23.6$, 94.6, 111.9 (d, $J_{\text{C-F}}=20.3$ Hz), 112.5, 116.1 (d, $J_{\text{C-F}}=24.4$ Hz), 119.7, 120.9, 121.3, 126.6 (d, $J_{\text{C-F}}=10.6$ Hz), 128.2, 129.8, 133.2, 136.7, 142.1, 151.9 (d, $J_{\text{C-F}}=13.5$ Hz), 155.6, 157.5, 161.4, 162.9, 164.7, 164.9, 164.8 ppm (d, $J_{\text{C-F}}=251.8$ Hz); HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{FN}_8\text{O}$: 481.1901, found: 481.1884.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(2-phenylquinolin-4-ylamino)benzamide (16):** Compound **16** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (30 mg, 0.09 mmol) and 4-chloro-2-phenylquinoline (22 mg, 0.09 mmol). Purification by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10→0:100) gave compound **16** as a white solid (16 mg, 33%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.13 (br s, 2H), 7.45–7.48 (m, 1H), 7.50–7.53 (m, 2H), 7.56–7.60 (m, 3H), 7.65–7.69 (m, 4H), 7.72 (s, 1H), 7.69 (td, $J=6.9$, 1.3 Hz, 1H), 8.00 (dd, $J=8.4$, 1.0 Hz, 1H), 8.04 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.09–8.11 (m, 2H), 8.39 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.95 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 10.10 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=24.0$, 95.0, 101.2, 120.0, 120.1, 120.1, 121.2, 122.6, 125.4, 127.5, 129.1, 129.2, 129.7, 129.7, 130.0, 130.4, 133.6, 137.0, 139.9, 147.7, 149.5, 157.1, 161.8, 163.4, 164.9, 165.3 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}$: 538.2355, found: 538.2348.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(7H-purin-6-ylamino)benzamide (17):** Compound **17** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (50 mg, 0.15 mmol) and 6-chloropurine (23 mg, 0.15 mmol). Purification by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0→60:40) gave compound **17** as a white solid (3 mg, 5%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=2.08$ (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 7.65 (d, $J=2.8$ Hz, 4H), 7.91 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 9.96 ppm (s, 1H); MS (ESI): $m/z=453.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)-phenyl]-4-(acridin-9-ylamino)benzamide (18):** Compound **18** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **9** (60 mg,

0.18 mmol) and 9-chloroacridine (38 mg, 0.18 mmol). Purification by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) gave compound **18** as a white solid (51 mg, 55%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.07 (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.11 (br s, 2H), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.90–6.99 (m, 2H), 7.35 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 7.70–7.60 (m, 5H), 7.85–7.79 (m, 2H), 7.97 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.15 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 8.92 (br s, 1H), 10.01 (br, 1H), 11.05 ppm (br s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 23.5, 94.6, 114.8, 116.8, 117.7, 119.7, 120.8, 121.1, 124.3, 125.1, 127.2, 129.1, 129.6, 129.7, 130.4, 131.7, 133.4, 136.5, 150.8, 157.1, 161.4, 162.9, 164.7, 164.9 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}$: 512.2193, found: 512.2198.

N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(isonicotinamide)benzamide (19): A suspension of isonicotinoyl chloride hydrochloride (50 mg, 0.28 mmol) in pyridine (0.5 mL) was cooled to 0 °C, and a solution of amine **9** (94 mg, 0.28 mmol) in pyridine (1.5 mL) was added dropwise. The reaction was stirred at RT overnight. The mixture was then filtered, and the isolated solid was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 70:30) to give compound **19** as a white solid (38 mg, 30%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.07 (s, 3H), 5.88 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 7.68 (s, 4H), 7.99 (d, J = 5.2 Hz, 6H), 8.77 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 9.14 (s, 1H), 10.30 ppm (s, 1H); HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_2$: 440.1835, found: 440.1817.

N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(nicotinamide)benzamide (20): Compound **20** was synthesized according to the procedure described for **19**, using nicotinoyl chloride hydrochloride (100 mg, 0.56 mmol) and amine **9** (188 mg, 0.56 mmol). Purification by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 70:30) gave compound **20** as a light brown solid (40 mg, 30%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.27 (s, 3H), 6.13 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H), 7.92–8.03 (m, 4H), 7.95 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.01 (d, 8.8 Hz, 2H), 8.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.79 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 9.14 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 10.27 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 12.49 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 18.4, 97.1, 112.6, 119.5, 120.7, 123.6, 128.6, 129.8, 130.3, 133.7, 135.7, 141.9, 148.9, 152.3, 155.8, 161.4, 164.4, 164.8 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_2$: 440.1835, found: 440.1825.

N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(2-hydroxynicotinamide)benzamide (21): Compound **21** was synthesized according to the procedure described for **19**, upon use of 2-hydroxy-3-nicotinic acid (90 mg, 0.65 mmol) and amine **9** (72 mg, 0.22 mmol). The resulting mixture was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 60:40) and by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) to give compound **21** as a light yellow solid (20 mg, 20%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.08 (s, 3H), 5.85 (s, 1H), 6.12 (s, 2H), 6.53 (dd, J = 7.2, 5.9 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.66 (s, 4H), 7.87 (dd, J = 5.9, 2.3 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.38 (dd, J = 7.2, 2.3 Hz, 1H), 8.95 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 13.04 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 23.6, 94.6, 107.1, 118.2, 118.9, 119.7, 120.9, 128.8, 129.5, 133.2, 136.6, 141.6, 143.2, 143.4, 161.4, 163.0, 164.5, 164.6, 164.9 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_3$: 456.1784, found: 456.1753.

N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)-phenyl]-4-(quinoline-4-carboxylamide)benzamide (22): Compound **22** was synthesized according to the procedure described for **19**, using quinoline carboxylic acid (85 mg, 0.49 mmol) and amine **9** (82 mg, 0.25 mmol). Purification by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 70:30) gave compound **22** as a light yellow solid (27 mg, 23%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.12 (s, 3H), 5.91 (s, 1H),

7.86 (td, J = 6.7, 1.3 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 7.86 (td, J = 6.9, 1.4 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.15 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 8.66 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 1H), 9.06 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 9.25 (br s, 1H), 10.16 (s, 1H), 11.08 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 22.5, 95.1, 119.3, 119.4, 120.0, 124.0, 125.2, 125.3, 126.5, 127.1, 128.7, 129.6, 130.2, 130.4, 133.7, 136.2, 141.6, 141.7, 148.0, 148.4, 150.4, 150.5, 161.5, 164.6, 165.7 ppm; MS (ESI): m/z = 490 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(methylamino)benzamide (23) and N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)phenyl]-4-(pyridin-3-ylmethylamino)benzamide (24): Pyridinium chlorochromate (PCC; 395 mg, 1.83 mmol) was added to a solution of 4-pyridinemethanol (100 mg, 0.92 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL), and the mixture was stirred for 90 min at RT. The resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (25 mL) and then washed with water (2 \times 25 mL) and brine (1 \times 25 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in MeOH (2 mL), treated with Et_3N (38 mg, 0.38 mmol) and amine **9** (40 mg, 0.12 mmol), and the solution was stirred at RT for 3.5 h. AcOH (0.053 mL) and NaBH_3CN (30 mg) were then added, and the solution was stirred at RT overnight. The resulting mixture was purified by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) to give compound **23** as a light brown solid (9 mg, 17%) and compound **24** as a pale brown solid (1.1 mg, 3%). Compound **23**: ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.07 (s, 3H), 2.73 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 5.83 (s, 1H), 6.09 (s, 2H), 6.31 (q, J = 4.9 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.62 (s, 4H), 8.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.89 (s, 1H), 9.70 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 23.5, 29.3, 94.5, 110.4, 119.7, 120.6, 121.1, 133.7, 136.1, 152.5, 161.4, 162.9, 169.2, 164.8, 165.0 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}$: 371.1771, found: 371.1589. Compound **24**: ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.09 (s, 3H), 4.42 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 5.84 (s, 1H), 6.10 (s, 2H), 6.62 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.03 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 7.61 (s, 4H), 7.72 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.51 (d, 6.0 Hz, 2H), 8.91 (s, 1H), 9.71 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 23.9, 45.3, 94.9, 111.7, 120.1, 121.1, 122.4, 122.7, 129.6, 134.0, 136.5, 149.5, 150.0, 151.4, 161.8, 163.8, 165.3, 165.4 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{ONa}$: 448.1862, found: 448.1844.

N-[4-(2-Amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)-phenyl]-4-(pyridin-4-ylmethylamino)benzamide (25): MnO_2 (2.10 g, 24.2 mmol) was added to a solution of 3-pyridinemethanol (330 mg, 3.0 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL), and the reaction mixture was stirred at RT overnight. The mixture was filtered through a pad of celite, and solvent was removed in vacuo. The residue was dissolved in MeOH (5 mL), treated with Et_3N (100 mg, 0.99 mmol) and amine **9** (80 mg, 0.24 mmol), and then stirred at RT overnight. AcOH (0.150 mL) and NaBH_3CN (145 mg) were then added, and the solution was stirred at RT for 3 h. The resulting mixture was purified by preparative HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) to give compound **25** as a light yellow solid (98 mg, 96%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.06 (s, 3H), 4.39 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 5.84 (s, 1H), 6.10 (s, 2H), 6.65 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 7.60 (br s, 4H), 7.72 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.75 (dt, J = 7.8 Hz, 1.8 Hz, 1H), 8.45 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.60 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.90 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 23.6, 43.6, 94.5, 111.3, 119.7, 120.6, 121.9, 123.6, 129.2, 133.7, 135.1, 135.1, 136.2, 148.1, 149.0, 151.0, 161.4, 162.9, 164.9, 165.0 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}$: 426.2042, found: 426.2037.

N-(4-Nitrophenyl)quinolin-4-amine (26): Compound **26** was synthesized according to the procedure described for **6**, using 4-nitroaniline (4.13 g, 29.90 mmol) and 4-chloroquinoline (4.89 g, 29.90 mmol). The reaction mixture was filtered, and the resulting solid was rinsed with Et₂O and dried in vacuo to afford compound **26** as a pale brown solid (3.73 g, 47%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 7.26 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.87 (td, *J* = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 8.08 (td, *J* = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 8.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 11.23 (s, 1H), 15.03 ppm (s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 102.2, 118.6, 121.0, 124.4, 125.8, 128.0, 134.6, 139.0, 144.0, 144.6, 145.2, 154.3 ppm; HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₄H₂₄N₇O: 266.0924, found: 266.0928.

N-(Quinolin-4-yl)benzene-1,4-diamine (27): Compound **27** was synthesized according to the procedure described for **7**, using **26** (3.73 g, 14.07 mmol). The filtrate was concentrated in vacuo and purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:0→70:30) to give amine **27** as a brown solid (2.93 g, 89%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 5.33 (br s, 2H), 6.56 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.63–7.70 (m, 1H), 7.86–7.91 (m, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 10.11 ppm (br s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 99.5, 114.5, 117.4, 122.6, 122.9, 125.5, 126.1, 126.7, 132.5, 141.2, 144.6, 148.1, 154.1 ppm; MS (ESI): *m/z* = 236 [M + H]⁺.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-nitrobenzamide (28): Compound **28** was synthesized according to the procedure described for **8**, using 4-nitrobenzoyl chloride (1.37 g, 7.40 mmol) and amine **27** (1.74 g, 7.40 mmol). The filtrate was concentrated in vacuo and purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:0→70:30) to give compound **28** as a yellow solid (2.60 g, 93%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 6.84 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.69–7.75 (m, 2H), 7.88–7.91 (m, 1H), 7.93–7.98 (m, 3H), 8.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.50 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 10.76 ppm (s, 1H); MS (ESI): *m/z* = 385 [M + H]⁺.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-aminobenzamide (29): Compound **29** was synthesized according to the procedure described for **7**, using **28** (1.40 g, 3.64 mmol). The filtrate was concentrated in vacuo and purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:0→80:20) to give amine **29** as a yellow solid (326 mg, 25%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 5.77 (s, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.65 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.84–7.81 (m, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.91 (br d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.63 (br d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.89 ppm (br s, 1H); MS (ESI): *m/z* = 355 [M + H]⁺.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-(2-amino-6-methylpyrimidin-4-ylamino)benzamide (30): Compound **30** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **29** (70 mg, 0.20 mmol) and 2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine (43 mg, 0.30 mmol). Purification by preparative HPLC (H₂O/CH₃CN, 90:10→0:100) gave compound **30** as a white solid (58 mg, 64%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 5.95 (s, 1H), 6.27 (br s, 2H), 6.83 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.52 (td, *J* = 6.9, 1.2 Hz, 1H), 7.69 (td, *J* = 6.8, 1.3 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.86 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 1H), 7.94–7.88 (m, 4H), 8.39 (br d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.92 (br s, 1H), 9.34 (br s, 1H), 10.12 ppm (br s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 23.6, 95.5, 100.9, 117.9, 119.5, 121.3, 122.0, 123.5, 124.5, 126.7, 128.5, 129.2, 129.2, 135.6, 135.8, 144.2, 148.2, 148.9, 150.7, 161.1, 162.9, 164.9, 165.6 ppm;

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₇H₂₄N₇O: 462.2037, found: 462.2034.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-(pyridin-4-ylamino)benzamide (31): Compound **31** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **29** (55 mg, 0.16 mmol) and 4-chloropyridine hydrochloride (47 mg, 0.31 mmol). Purification by preparative HPLC (H₂O/CH₃CN, 90:10→0:100) gave compound **31** as a yellow solid (25 mg, 38%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 6.84 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.52 (td, *J* = 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.69 (td, *J* = 6.9, 1.2 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.28 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.93 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 10.17 ppm (s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 100.8, 110.2, 117.6, 119.4, 121.2, 121.9, 123.3, 124.4, 127.6, 129.0, 129.1, 129.1, 135.5, 135.6, 143.8, 148.1, 148.8, 148.8, 150.2, 157.6, 164.6 ppm; HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₇H₂₂N₅O: 432.1824, found: 432.1815.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-ylamino)benzamide (32): Compound **32** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **29** (80 mg, 0.24 mmol) and 2,6-diamino-4-chloropyrimidine (32 mg, 0.24 mmol). Purification by preparative HPLC (H₂O/CH₃CN, 90:10→0:100) gave compound **32** as a white solid (39 mg, 38%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 5.26 (s, 1H), 5.76 (br s, 2H), 5.92 (br s, 2H), 6.82 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.52 (td, *J* = 6.9, 1.4 Hz, 1H), 7.69 (td, *J* = 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.88–7.82 (m, 5H), 8.39 (br d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.92 (br s, 2H), 10.06 ppm (br s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 77.5, 100.9, 117.4, 117.7, 119.5, 121.3, 122.0, 123.5, 124.5, 125.6, 128.4, 129.2, 135.5, 135.9, 145.2, 148.2, 148.9, 150.7, 161.0, 162.9, 164.8, 165.0 ppm; HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₆H₂₃N₈O: 463.1989, found: 463.1987.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-(2-phenylquinolin-4-ylamino)benzamide (33): Compound **33** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **29** (80 mg, 0.24 mmol) and 4-chloro-2-phenylquinoline (81 mg, 0.34 mmol). Purification by preparative HPLC (H₂O/CH₃CN, 90:10→0:100) gave compound **33** as a white solid (116 mg, 92%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 6.85 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.54–7.46 (m, 4H), 7.62–7.56 (m, 3H), 7.69 (td, *J* = 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.77 (td, *J* = 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.85–7.88 (m, 3H), 8.01 (dd, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.09–8.11 (m, 2H), 8.40 (br d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.44 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.94 (br s, 1H), 9.34 (br s, 1H), 10.15 ppm (br s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 101.4, 120.0, 120.1, 121.7, 122.5, 122.7, 123.9, 124.9, 125.5, 125.6, 127.5, 128.9, 129.2, 129.6, 129.7, 129.8, 130.0, 136.1, 136.2, 139.6, 139.9, 144.9, 147.7, 148.6, 149.3, 149.5, 151.1, 157.1, 165.2 ppm; HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₇H₂₈N₅O: 558.2288, found: 558.2292.

N-(4-Nitrophenyl)-4-nitrobenzamide (34): Compound **34** was synthesized according to the procedure described for **8**, using 4-nitrobenzoyl chloride (6.72 mg, 3.62 mmol) and 4-nitroaniline (5.0 g, 3.62 mmol). Filtration of the precipitate and drying in vacuo gave compound **34** as a yellow solid (10.29 mg, 99%): ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ = 8.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.29 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 11.20 ppm (br s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, [D₆]DMSO): δ = 120.1, 123.6, 124.8, 129.6, 139.8, 142.8, 145.0, 149.4, 164.7 ppm.

N-(4-Aminophenyl)-4-aminobenzamide (35): Compound **35** was synthesized according to the procedure described for **7**, using

compound **34** (5.10 g, 17.8 mmol). Filtration over a pad of silica and concentration in vacuo gave diamine **35** as a brown solid (1.08 g, 27%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 5.72 (br s, 4H), 6.57 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.61 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 9.45 ppm (br s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 112.9, 116.5, 121.8, 122.3, 129.6, 131.9, 140.4, 152.2, 165.2 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$: 250.0951, found: 250.0951.

N-[4-(Pyridin-4-ylamino)phenyl]-4-(pyridin-4-ylamino)benzamide (36): Compound **36** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **35** (80 mg, 0.35 mmol) and chloropyridine hydrochloride (110 mg, 0.74 mmol). Purification by HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) gave compound **36** as a white solid (57 mg, 43%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 6.84 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.96 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.16 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 8.28 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 8.72 (br s, 1H), 9.18 (br s, 1H), 10.10 ppm (br s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 108.8, 110.3, 117.8, 120.9, 121.4, 127.7, 129.2, 134.6, 135.8, 143.9, 148.9, 150.1, 150.4, 150.5, 164.6 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}$: 382.1662, found: 382.1661.

N-[4-(Quinolin-4-ylamino)phenyl]-4-(quinolin-4-ylamino)benzamide (37): Compound **37** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **35** (80 mg, 0.35 mmol) and 4-chloroquinoline (173 mg, 1.06 mmol). Purification by HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) gave compound **37** as a white solid (86 mg, 51%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 6.84 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.53 (td, J = 7.1 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.58 (td, J = 7.1 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.69 (td, J = 6.8 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.74 (td, J = 6.7 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.88–7.83 (m, 3H), 7.93 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.38 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.59 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.97 (br s, 1H), 9.27 (br s, 1H), 10.23 ppm (br s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 101.0, 103.8, 119.5, 119.7, 120.5, 121.4, 122.4, 122.4, 123.5, 124.6, 125.1, 128.6, 129.1, 129.2, 129.3, 129.4, 129.6, 135.7, 135.7, 144.4, 146.4, 148.3, 148.8, 149.1, 150.6, 150.8, 164.8 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}$: 482.1975, found: 482.1974.

N-[4-(Acridin-9-ylamino)phenyl]-4-(acridin-9-ylamino)benzamide (38): Compound **38** was synthesized according to the procedure described for **10**, using amine **35** (50 mg, 0.22 mmol) and 9-chloroacridine (118 mg, 0.55 mmol). Purification by HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10 \rightarrow 0:100) gave compound **38** as a white solid (40 mg, 31%): ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 6.74 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.97–6.92 (m, 4H), 7.51–7.41 (m, 8H), 7.71 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.92 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 9.91 ppm (br s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 117.4, 118.0, 118.5, 119.6, 120.3, 121.7, 121.8, 124.8, 126.9, 129.3, 130.4, 130.9, 133.5, 145.4, 151.5, 157.3, 164.9 ppm; HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$: 582.2288, found: 582.2281.

Docking analysis

The structure of *Haemophilus haemolyticus* cytosine-5 DNA methyltransferase (MHhal C5 DNMT) was taken from the Protein Data Bank (PDB: 2HR1^[16]). Discovery Studio 3.0 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) to prepare the enzyme structures; alternate conformations were removed and incomplete chains with missing residues and hydrogen atoms were added. The ligands were docked under standard conditions using SYBYL-X 1.3 software (surflex-dock V2) from Tripos L.P. (St. Louis, MO, USA). The images were prepared with Benchware 3D Explorer, also from Tripos.

Biological evaluation

DNMT3A assay: DNMT3A enzyme inhibition was adapted from the restriction-based fluorescence assay protocol described by Ceccaldi et al.^[20] Briefly, a 5'-labelled biotin oligonucleotide was hybridized to its complementary strand labelled with 6-carboxyfluorescein at the 3'-end and transferred into a 384-well microplate (black Opti-plates; PerkinElmer) pre-coated with avidin. The duplex contains a unique CpG site overlapping with a restriction site of a methylation-sensitive restriction enzyme. The human C-terminal DNMT3A (a.a. 623–908), produced as described in Ref. [20], was added to each well (200 ng/well) and mixed with the chemical compounds at the desired concentration and freshly prepared AdoMet (20 μM final concentration) to start the reaction in a total volume of 50 μL . After 1 h incubation at 37 °C, each well was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 and NaCl (500 mM) and three more times with phosphate-buffered saline Tween-20 (PBST). Specific fluorescence signals were detected with the methylation-sensitive restriction enzyme HpyCH4IV (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) as described, and measured on a PerkinElmer Envision detector. The percent inhibition was calculated according to Equation (1), where X is the signal determined in the absence of the inhibitor and Y is the signal obtained in the presence of the inhibitor.

$$\% \text{ Inhib.} = [(X - Y) / X] \times 100 \quad (1)$$

The ligand concentration at which 50% inhibition of enzyme activity is observed (EC_{50}) was determined by analysis of a concentration range of the test compounds in triplicates. Nonlinear regression fittings with sigmoidal dose-response (variable slope) were performed with Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

DNMT1 and G9A assay: His-DNMT1 (182 kDa, human) was cloned, expressed and purified as described by Lee et al.^[21] The assays were performed as described in the literature.^[22] The reaction was performed in a total reaction volume of 10 μL in low-volume non-binding surface (NBSTM) 384-well microplates (Corning Inc.), containing test compound (up to 1% DMSO), 1 μM of S-adenosyl-L-methionine (SAM)/[methyl-3H]SAM (3 TBq mmol⁻¹, PerkinElmer) mix in a ratio of 3:1 (isotopic dilution 1*:3), 0.3 μM of biotinylated hemimethylated DNA duplex (5'-GATmCGmCGATGmCGmCGAAT-mCGmCGATmCGATGmCGAT-3' and BIOT-5'-ATCGCATCGATCGCATCGCGCATCGCGATC-3'), and 90 nM of DNMT1 in methylation buffer (20 mM HEPES (pH 7.2), 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bovine serum albumin). The reaction was incubated at 37 °C for 2 h, then an aliquot (8 μL) was transferred into a streptavidin 96-well scintillant-coated FlashPlate (PerkinElmer) containing 20 μM S-adenosyl-L-homocysteine (SAH; 190 μL) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). The FlashPlate was agitated at RT for 1 h, washed three times with 200 μL of 0.05% TweenR-20 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), and read in 200 μL of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) on TopCount NXT (PerkinElmer).

CMV-luc reexpression: KG-1 cells, stably transfected with the firefly luciferase (luc+) from pGL3 by Promega) reporter gene under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter (from pEGFP-N1 by Clontech Laboratories Inc.) partially methylated (50%), was seeded at 20000 cells per well in a 96-well plate. After 24 h incubation in the presence of the test compound or solvent (DMSO), the induction of the promoter was measured by quantification of luciferase with the Brite-lite assay system (PerkinElmer) according to the manufacturer's protocol. The luminescence was measured on an EnVision multilabel plate reader (PerkinElmer), and the data are ex-

pressed as the fold induction as compared with the DMSO control. The mean of three experiments and the standard error is reported.

Antiproliferative activity: KG-1 human leukemia cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultivated in RPMI-1640 medium containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and L-glutamine (BE12-115F, Lonza, France) supplemented with 15% fetal calf serum (Lonza, France), at 37 °C and under 5% CO₂. Cells (2 × 10⁴) were seeded at day 0 in a 96-well plate. Solutions of test compound, stored at −20 °C as a 10^{−2} M stock solution in 100% DMSO, were freshly prepared by dilution on day 1 in RPMI-1640 medium. Cells were treated with test compound solutions at a dose range from 3.2 nM to 10 μM. Treatment was repeated on days 2 and 3, and on day 4, cell viability was assessed using the ATPlite kit (AT-Plite 1step Luminescence Assay System, ref: 3016739, PerkinElmer), following the manufacturer's instructions. Raw data were analyzed with Prism 4.03 to generate EC₅₀ values corresponding to the compound concentration required to cause a 50% decrease in cell viability as compared with untreated controls. The values presented are the mean of at least two independent experiments.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Jacques Fahy (USR3388 EtAc CNRS-Perre Fabre) for initiating the program and Dr. Georges Massiot (USR3388 EtAc CNRS-Perre Fabre) for proofreading the manuscript. P.B.A. is a recipient of an ATIP award of the French National Center for Scientific Research (CNRS), Equipe d'Excellence Region Midi Pyrenées (France) and the European Regional Development Fund (FEDER) CNRS-Région Midi Pyrenées (France).

Keywords: cytotoxicity • DNA methyltransferases • epigenetics • gene re-expression • inhibitors

- [1] a) G. Auclair, M. Weber, *Biochimie* **2012**, *94*, 2202–2211; b) S. Sharma, T. K. Kelly, P. A. Jones, *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27–36; c) S. B. Baylin, P. A. Jones, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 726–734; d) A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396–398; e) M. M. Suzuki, A. Bird, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 465–476.
- [2] a) S. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhattar, A. Shilatifard, *Genes Dev.* **2009**, *23*, 781–783; b) M. A. Dawson, T. Kouzarides, *Cell* **2012**, *150*, 12–27.
- [3] a) M. Esteller, *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1148–1159; b) R. A. Juergens, J. Wrangle, F. P. Vendetti, S. C. Murphy, M. Zhao, B. Coleman, R. Seebree, K. Rodgers, C. M. Hooker, N. Franco, B. Lee, S. Tsai, I. E. Delgado, M. A. Rudek, S. A. Belinsky, J. G. Herman, S. B. Baylin, M. V. Brock, C. M. Rudin,

- Cancer Discovery* **2011**, *1*, 598–607; c) L. Shen, H. Kantarjian, Y. Guo, E. Lin, J. Shan, X. Huang, D. Berry, S. Ahmed, W. Zhu, S. Pierce, Y. Kondo, Y. Oki, J. Jelinek, H. Saba, E. Estey, J. P. Issa, *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 605–613.
- [4] a) X. Cheng, R. M. Blumenthal, *Structure* **2008**, *16*, 341–350; b) R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 206–222.
- [5] a) J. Fahy, A. Jeltsch, P. B. Arimondo, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 1427–1442; b) C. Gros, J. Fahy, L. Halby, I. Dufau, A. Erdmann, J. M. Gregoire, F. Ausseil, S. Vispe, P. B. Arimondo, *Biochimie* **2012**, *94*, 2280–2296.
- [6] J. M. Foulks, K. M. Parnell, R. N. Nix, S. Chau, K. Swierczek, M. Saunders, K. Wright, T. F. Hendrickson, K. K. Ho, M. V. McCullar, S. B. Kanner, *J. Biomol. Screening* **2012**, *17*, 2–17.
- [7] J. Datta, K. Ghoshal, W. A. Denny, S. A. Gamage, D. G. Brooke, P. Phiasivongsa, S. Redkar, S. T. Jacob, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4277–4285.
- [8] G. J. Atwell, B. F. Cain, *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 673–678.
- [9] D. Jia, R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch, X. Cheng, *Nature* **2007**, *449*, 248–251.
- [10] J. Song, O. Rechtkoblit, T. H. Bestor, D. J. Patel, *Science* **2011**, *331*, 1036–1040.
- [11] J. Song, M. Teplova, S. Ishibe-Murakami, D. J. Patel, *Science* **2012**, *335*, 709–712.
- [12] a) J. L. Medina-Franco, T. Caulfield, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 418–425; b) J. L. Medina-Franco, F. Lopez-Vallejo, D. Kuck, F. Lyko, *Mol. Diversity* **2011**, *15*, 293–304; c) J. L. Medina-Franco, J. Yoo, *Mol. Diversity* **2013**, *17*, 337–344; d) J. L. Medina-Franco, J. Yoo, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2138–2147; e) J. Yoo, J. L. Medina-Franco, *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* **2012**, *8*, 317–329; f) J. Yoo, J. L. Medina-Franco, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 555–567; g) J. Yoo, J. L. Medina-Franco, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3475–3487.
- [13] J. Yoo, J. H. Kim, K. D. Robertson, J. L. Medina-Franco, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2012**, *87*, 219–247.
- [14] J. Yoo, S. Choi, J. L. Medina-Franco, *PLoS One* **2013**, *8*, e62152.
- [15] K. Takeshita, I. Suetake, E. Yamashita, M. Suga, H. Narita, A. Nakagawa, S. Tajima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 9055–9059.
- [16] F. K. Shieh, B. Youngblood, N. O. Reich, *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 516–527.
- [17] P. Phiasivongsa, S. Redkar, S. A. Gamage, D. G. Brooke, W. A. Denny, D. Bearss, H. Vankayalapati, (SuperGen Inc., Dublin, CA, USA), PCT Int. Pat. Appl. WO 2009/049132 A1, **2009**.
- [18] P. E. Zhichkin, L. H. Peterson, C. M. Beer, W. M. Rennells, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8954–8959.
- [19] S. A. Gamage, D. G. Brooke, S. Redkar, J. Datta, S. T. Jacob, W. A. Denny, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3147–3153.
- [20] A. Ceccaldi, A. Rajavelu, C. Champion, C. Rampon, R. Jurkowska, G. Jankevicius, C. Senamaud-Beaufort, L. Ponger, N. Gagey, H. D. Ali, J. Tost, S. Vriz, S. Ros, D. Dauzonne, A. Jeltsch, D. Guianvarc'h, P. B. Arimondo, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1337–1345.
- [21] B. H. Lee, S. Yegnasubramanian, X. Lin, W. G. Nelson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40749–40756.
- [22] C. Gros, L. Chauvigne, A. Poulet, Y. Menon, F. Ausseil, I. Dufau, P. B. Arimondo, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e185.

Published online on February 13, 2014

Annexe A.3.

Design and synthesis of new non nucleoside inhibitors of DNMT3A.

(2015) *Bioorg Med Chem.* 23 (17), 5946-5953.

Alexandre Erdmann, Yoann Menon, Christina Gros, Nicolas Molinier, Natacha Novosad, Arnaud Samson, Jean-Marc Gregoire, Christophe Long, Frédéric Ausseil, Ludovic Halby and Paola B. Arimondo.

Résumé de l'article

Des molécules de type propiophénone ont été identifiées lors du criblage de la chimiothèque Pierre Fabre pour l'inhibition de la DNMT3A. Parmi les 66 000 composés chimiques qui ont été criblés, une inhibition de l'enzyme a été observée avec 25 analogues appartenant à cette classe de molécules, constituant ainsi un point de départ pour une étude SAR vis-à-vis de l'inhibition de l'enzyme.

Cette étude a abouti à une molécule hit (**1** dans l'article) à partir de laquelle Alexandre Erdmann a synthétisé de nouveaux dérivés durant sa thèse en chimie. Au cours de ses travaux, plusieurs modifications ont été réalisées sur cette molécule, dont les plus intéressantes nous ont menés vers le composé **33** (EC₅₀ = 2.1 μM). Ce composé montre cependant une réactivité et pourrait éventuellement réagir avec la cystéine catalytique de la DNMT. Cette étude ouvre de nouvelles réflexions concernant la conception d'inhibiteur non nucléosidiques covalent pour mimer la 5azadC.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Design and synthesis of new non nucleoside inhibitors of DNMT3A



Alexandre Erdmann, Yoann Menon, Christina Gros, Nicolas Molinier, Natacha Novosad, Arnaud Samson, Jean-Marc Gregoire, Christophe Long, Frédéric Ausseil, Ludovic Halby, Paola B. Arimondo*

Unité de Service et de Recherche CNRS-Pierre Fabre n°3388, ETaC, CRDPF, 3 Avenue Hubert Curien, 31100 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2015

Revised 23 June 2015

Accepted 24 June 2015

Available online 10 July 2015

Keywords:

DNA methylation

DNMT3A

Reactive inhibitor

Michael acceptor

ABSTRACT

DNA methylation, an epigenetic modification regulating gene expression, is a promising target in cancer. In an effort to identify new non nucleosidic inhibitors of DNA methyltransferases, the enzymes responsible for DNA methylation, we carried out a high-throughput screening of 66,000 chemical compounds based on an enzymatic assay against catalytic DNMT3A. A family of propiophenone derivatives was identified. After chemical optimization and structure activity relationship studies, a new inhibitor (**33**) was obtained with an EC_{50} of 2.1 μ M against DNMT3A. The mechanism of inhibition of the compound was investigated as it forms a reactive Michael acceptor group in situ. Thereby, the Michael acceptor **20** was identified. This compound was further characterized for its biological activity in cancer cells.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epigenetic modification participates to modulate the transcription of the genetic information in cells without alteration of the DNA sequence. Mainly, these are chemical modifications of DNA or histones. These chemical events regulate the compaction of the chromatin, controlling the access to the DNA information.¹ In particular, DNA methylation occurs on cytosine in a CpG context. In cancer, hypermethylation of CpG, regrouped in islands on the promoters of tumor suppressor genes, leads to their silencing and participates to tumor formation, progression and maintenance.² Additionally, hypomethylation of the gene body allows expression of repeated sequences and transposons and consequently participates to genomic instability. DNA methylation is ensured by the mammalian DNA methyltransferases (DNMT1, 3A, 3B and 3L), which differ in role in cells.³ DNMT3A and 3B are de novo methyltransferases, which are able to methylate fully unmethylated DNA. This reaction is catalyzed by DNMT3L in complex with the 3A and 3B.⁴ DNMT1 is a maintenance methyltransferase capable of completing the methylation of hemimethylated DNA strands. These enzymes transfer a methyl group from the SAM (S-adenosyl-L-methionine) cofactor to the position 5 of the cytosine. The inhibition of DNMT is a promising anticancer strategy to erase the aberrant DNA methylation pattern that silences tumor suppressor genes. Several DNMT inhibitors already exist in the literature and are classified in two major groups.⁵ The

nucleosidic analogues, such as 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC), are powerful inhibitors used in clinic against hematological cancers: MDS, AML and CMML.⁶ These molecules form a suicide complex with the enzyme after incorporation into DNA and formation of an irreversible covalent bond with the catalytic cysteine. These inhibitors confirm DNMT as anticancer targets but suffer from poor biodisponibility, toxicity and chemical instability.⁷ Several non-nucleosidic inhibitors, such as SGI-1027 or RG108, were described.^{8,9} The advantage of this class of inhibitors is that they can offer various selectivity among the DNMT isoforms. Here we describe the discovery of a new scaffold for DNMT3A inhibition, its optimization, followed by a discussion of its mechanism of action to pave the way to the design of covalent non nucleosidic inhibitors.

2. Results and discussion

In order to discover new inhibitors of DNMT, a high-throughput screening was undertaken. This screening is based on an enzymatic assay to evaluate human catalytic DNMT3A inhibition. A double modified DNA substrate, bearing a biotin and 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5' end of each strand, is immobilized on a 384-well microplate through biotin/avidin interaction. This DNA duplex contains a unique CpG site overlapping a restriction site of the methylation sensitive restriction enzyme HpyCH4IV. The test is based on fluorescence detection after treatment with the chemical compounds. If the molecule is an efficient inhibitor, the unmethylated substrate will be cut, the FAM will be lost and the fluorescence will decrease. On the contrary, in the case

* Corresponding author. Tel.: +33 534506492; fax: +33 534503492.

E-mail address: paola.arimondo@etac.cnrs.fr (P.B. Arimondo).

of an inactive molecule, the DNMT will catalyze the methylation of DNA, the restriction enzyme will not cut the duplex and no loss of the fluorophore will be monitored. Our recently published assay allowed us to discover new chemical scaffolds as inhibitors of DNMT3A.^{10,11} A 66,000 molecule set of the Pierre Fabre Research Institute chemical library was screened at concentrations of 10 or 20 μM , depending on the stock solution concentration. This screening gave a panel of 312 hit molecules, representing 0.5% of total tested compounds. Interestingly, a family of molecules was identified and a panel of 32 molecules belonging to this family was screened, leading to a first structure activity relationship schematized in Figure 1 (and in Supplementary Table 1 and Fig. 1).

The most powerful compound **1** was identified as the lead molecule. Chemical information was collected from the comparison between the structures from the screening (Supplementary Fig. 1). First, the critical loss of activity of the alcohol **2** and ethers derivatives **3** and **4** (brown box in Fig. 1) indicates that the carbonyl plays an important role in the inhibition. The bicyclic ring cannot be separated from the carbon backbone of the structure by the introduction of a methylene group as shown by the weak activity of compounds **5**, **6** and **7** (blue box in Fig. 1). Noteworthy, the inhibition of DNMT3A seems stronger with azabicyclic systems, such as benzimidazole (compound **1**), than azamonomocyclic system, such as pyrazole or imidazole (compounds **8** and **9**, blue box in Fig. 1). The sulfur-substituted chain must be separated from the carbon backbone by a methylene group, indicated by the loss of activity when **1**, **11**, **12** and **13** are compared to **14**, **15**, **16** and **17** (red box in Fig. 1). Finally, a structure containing a small substituent in the sulfur chain, such as ethyl (**1**), is more potent than others bulkier substituents (**11**, **12** and **13**), at the exception of the benzyl group (**10**).

To further investigate the interest of this structure, **1** was engaged in further biological evaluations. An apparent EC_{50} of

3.0 μM was obtained for **1** in the screening showing a maximum inhibition efficacy of 70%. In addition, **1** was tested against human full-length DNMT1. Compared to SGI-1027, which is known to inhibit DNMT3A ($\text{EC}_{50} = 0.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$) and DNMT1 ($\text{EC}_{50} = 10.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$),^{8,12} compound **1** showed some selectivity between both enzymes with 70% and 22% of inhibition at 32 μM and 100 μM , respectively. DNMT3A and DNMT1 are described to catalyze methylation reaction on different DNA substrates, unmethylated DNA and hemimethylated DNA, respectively.¹³ Their ability to interact with different substrates and some differences in the amino-acid sequence of their respective active sites observed in the crystal structures¹⁴ encourage to consider that it is possible to develop a selective inhibitor for each enzyme, which can be an opportunity to understand the role of each DNMT.⁷ This issue could be further explored with this family of compounds.

Based on these biological properties, a chemical modulation was engaged on the structure of **1** to increase the inhibition activity against DNMT3A. Compound **1** is easily obtained by the synthesis pathway described in Scheme 1.

Bromopropiophenone **18** reacted with benzimidazole to form the corresponding intermediate **19** in 75% yield. The Michael acceptor **20** was isolated from the reaction of **19** with bisdimethylaminomethane under acidic conditions. The nucleophilic attack of ethanethiol on the Michael acceptor **20** yielded **1** (83%). The synthetic pathway is flexible enough to design a large number of derivatives.

Using this synthesis, several parts of the structure were modified. Various substituents were inserted into the sulfur chain, the sulfur atom was replaced by an oxygen atom, the benzimidazole by adenine, and the aromatic ring bearing the chlorine atom was also modified. A panel of 15 molecules was thus obtained and described in the structure activity relationships depicted in Figure 2.

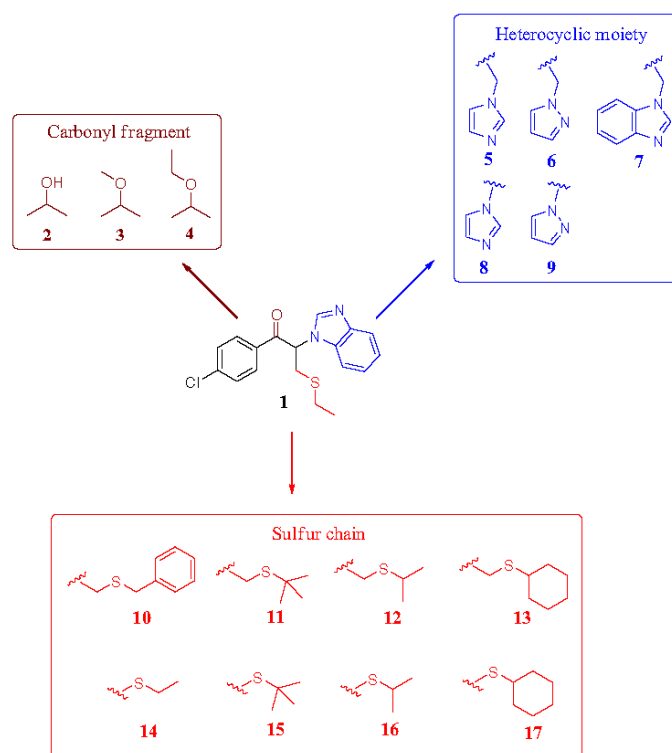
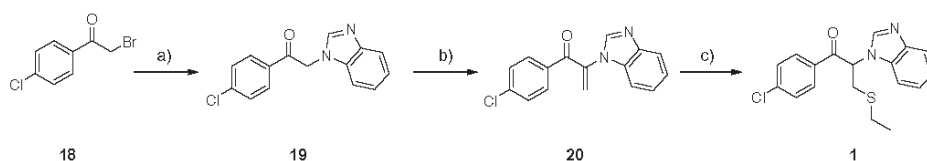


Figure 1. Chemical structures of 17 compounds from the screening campaign (Supplementary Table 1 and Fig. 1). The main chemical structure is separated in three fragments: the heterocyclic moiety (blue), the carbonyl fragment (brown), and the sulfur chain (red).



Scheme 1. Synthetic route to **1**. (a) Benzimidazole, K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , 75%. (b) $\text{CH}_2(\text{NMe}_2)_2$, Ac_2O , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}$, 95%. (c) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$, CH_2Cl_2 , 83%.

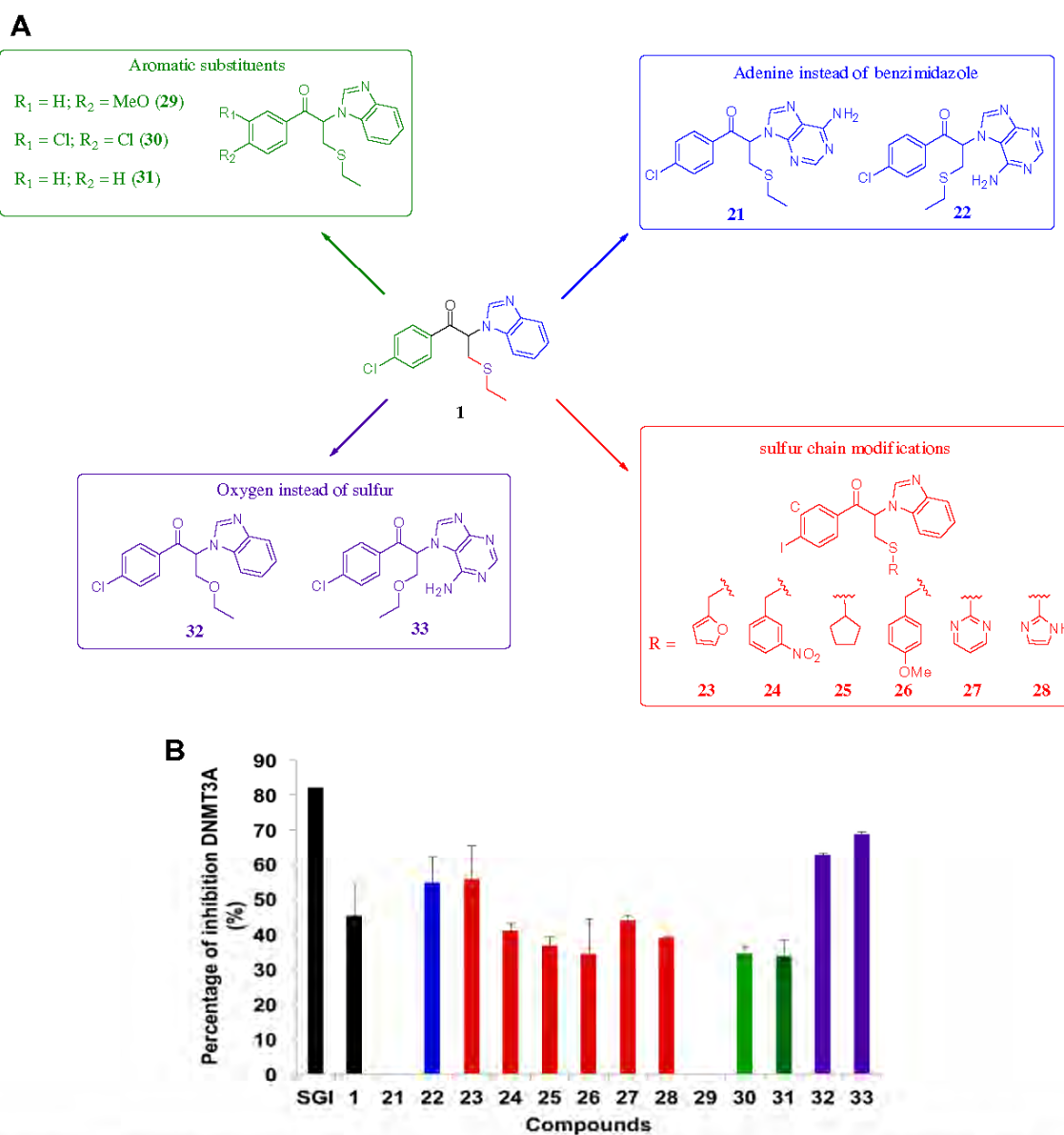


Figure 2. Structure activity relationship of compounds obtained by chemical modifications of **1**. (A) Compound **1** was separated in four fragments: the heterocyclic moiety (blue), the sulfur chain (red), the benzyl part (green) and the introduction of an oxygen atom (purple). (B) The percentage of DNMT3A inhibition was tested at 32 μM for all compounds and SGI-1027 was used as a reference inhibitor.⁸ Methylation activities were measured at least in duplicate. The mean value \pm SD is shown.

The synthesis of compounds **1** and **10** did not confirm the DNMT3A inhibition activity identified in the screening (Supplementary Table 1), however interesting information were obtained for the others compounds (Supplementary Table 1). None of the tested substituents on the sulfur chain significantly improved the inhibition activity of this family (compound **23**–

28); the ethyl chain appeared to be the best substituent. As shown in Figure 2, various modifications were performed on the phenyl ring, such as replacement of the chlorine atom by a hydrogen atom or a methoxy group and introduction of an additional chlorine atom (compound **29**–**31**): none showed significant improvement of the inhibition activity. Adenine was introduced in the structure

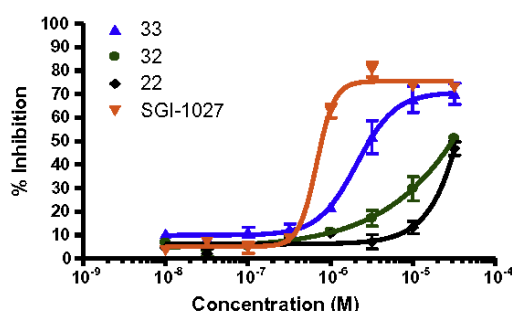


Figure 3. DNMT3A inhibition dose effect curves for compounds **22** (EC_{50} not calculated), **32** (EC_{50} not calculated) and **33** (EC_{50} = 2.1 μ M). SGI-1027 was used as a reference inhibitor. The mean values and the SD of three independent experiments are shown.

instead of benzimidazole to mimic the adenosyl moiety of the SAM cofactor. Two derivatives were obtained corresponding to the substitution of position N9 or N7 of adenine (compound **21** and **22**). Interestingly, **22** showed 47% of inhibition at 32 μ M, while **21** did not inhibit DNMT3A in the enzymatic assay. Finally, the sulfur atom was replaced by an oxygen atom in compound **32** and **33**. The best inhibitor was compound **33** with an EC_{50} of 2.1 μ M against DNMT3A. The dose effect curves are reported in Figure 3 for compound **22**, **32** and **33**.

Figure 3 shows the improvement of DNMT3A inhibition in the SAR study from the introduction of adenine (**22**) and the introduction of the oxygen atom (**32**) to the optimized inhibitor **33**. It is important to notice that **33** showed a slight inhibition of DNMT1 (29% at 100 μ M) as a confirmation of the selectivity.

Since we observed a discrepancy in the inhibition activity of compound **1** in the screening test compared to the one from the resynthesis, we investigated by HPLC the stability of the compounds in DMSO, the solvent used for storage of the chemical library. The main degradation product was identified as the Michael acceptor intermediate of the synthetic pathway. Indeed, a retro-Michael addition was observed in solution at room temperature. In particular, compound **33**, the most potent inhibitor, seemed to be particularly unstable probably due to the proximity of the primary amine of the adenine and the oxygenated chain and to the poor nucleophilic property of ethanol compared to thiol groups. Since the Michael acceptor containing the adenine moiety of compound **33** was difficult to isolate, our interest was focused on the Michael acceptor **20** containing the benzimidazole motif that we could isolate, purify and characterize. Chemical efforts were engaged to modify the structure to obtain stable analogues by deactivating the Michael acceptor moiety (Scheme 2). Substitution of the Michael acceptor function with dimethylamine and phenylethylene groups provided the more stable and less reactive compounds **34** and **35**.

The Brederick reaction occurred with **19** at room temperature to give compound **34** in a 48% yield. Furthermore, under basic

Table 1

Cytotoxic activity of **29** and **20** on three cancer cell lines: KG-1 (leukemia), Karpas299 (lymphoma) and HCT116 (colon) after three days of treatment. The 5-azadC nucleoside inhibitor and SGI-1027 non nucleoside inhibitors were used as reference

Compounds	EC_{50} (μ M)		
	KG-1	Karpas299	HCT116
5azadC	0.1 \pm 1.6	> 0	>10
SGI1027	4.4 \pm 1.6	1.8 \pm 0.3	>10
29	>10	>10	>10
20	3.7 \pm 2.4	>10	3.1 \pm 0.8

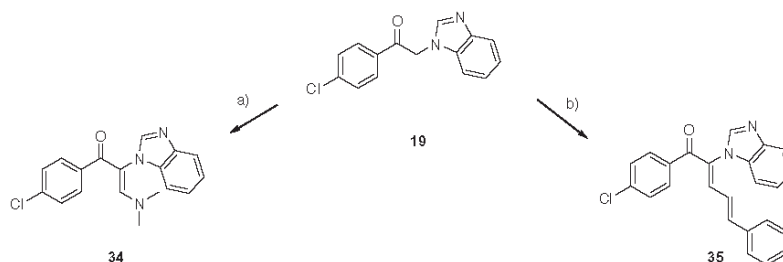
conditions, **19** reacted with cinnamaldehyde to form the hyperconjugated compound **35**. Compound **34** and **35** were inactive in the inhibition assay of DNMT3A, while an inhibition percentage of 81% at 32 μ M and an EC_{50} of 4.0 \pm 0.5 μ M was monitored for **20**. Altogether, these data suggest that the Michael acceptor derivative is the active structure detected in the enzymatic assay. Our hypothesis is that **20** enters in the catalytic pocket of DNMT3A and reacts with the catalytic cysteine and thus inhibits the methylation activity reaction. To support this hypothesis, we followed the reaction of compound **20** with glutathione by LC-MS. After dissolution of the compound in the buffer, glutathione was added in the solution and the LC-MS analysis was performed at 0, 1, 10, 30 and 60 min to follow the kinetics. The kinetics of the reaction showed the disappearance of all the starting material after 30 min. These results showed the rapid reaction of **20** with a thiol nucleophile group such as glutathione.

The cytotoxic effect of the compound **20** was evaluated on three tumoral cell lines (Table 1) to illustrate the effect of this Michael acceptor structure. Compound **29** was used as a negative control.

After three days of treatment, inhibitor **20** showed cytotoxicity against leukemia KG-1 and colon cancer HCT116 cells lines, while the inactive inhibitor **29** showed little cytotoxicity. Little effect was observed on the lymphoma Karpas299 cell line. These findings comfort us that the high reactivity of the Michael acceptor group does not induce non-specific cytotoxicity. Accordingly, the reference compounds, 5azadC and SGI-1027, present similar profiles.

3. Conclusions

In conclusion, a family of small molecules was isolated among a large chemical library for its ability to inhibit the DNMT3A. Compound **1** was identified as a selective inhibitor of DNA methyltransferase 3A. However, further chemical analysis did not confirm its potency, but SAR study resulted in the identification of an active structure **33** showing an EC_{50} of 2.1 μ M. By rapid degradation in DMSO, **33** is possibly transformed into a Michael acceptor, which most likely inhibits DNMT3A by forming a covalent bond with the catalytic cysteine of the enzyme. This was previously described for a maleimide derivative of RG108 as DNMT1 inhibitor.¹⁵ In the DNA methylation reaction,¹⁶ a thiol group of a cysteine residue in the active site of the DNMT attacks the C6-position of cytosine



Scheme 2. Synthetic route to stable derivatives of **20**. (a) Brederick reagent, DMF, RT, 12 h, 48%. (b) Cinnamaldehyde, t-BuOK, benzene, 80 °C, 4 h, 84%.

to generate a covalent bond between DNA and the enzyme. The newly created intermediate possesses nucleophilic properties at the C5-position to accept a methyl group from the SAM cofactor. The Michael acceptor of compound **33** is too unstable, so we further characterized compound **20**, which could be isolated, purified and well-characterized. Its inhibition mechanism could involve this catalytic cysteine residue in the active site of DNMT3A, similar to the suicide mechanism of 5-azadC. Further biological studies on covalent inhibitors should highlight whether this covalent bond between the enzyme and the substrate can induce global demethylation of DNA or gene reexpression in cancer lines. These findings are an additional proof of the interest for the design of covalent non nucleoside inhibitors of DNA methylation.⁷

4. Experimental section

4.1. General

All commercially available reagents and solvents were purchased from Sigma–Aldrich or Alfa-Aesar. All reactions were performed in anhydrous solvent under nitrogen atmosphere. Column chromatography was carried out on a puriflash 430 apparatus (Interchim) equipped with 30 μ m porated silica column. High resolution mass spectra were performed on a micrOTOF (Bruker). The NMR spectra were recorded on an Avance II spectrometer (Bruker) equipped with a ¹³C cryoprobe at 500 MHz for ¹H nucleus and 126 MHz for ¹³C nucleus. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) downfield of tetramethylsilane, using deuterated solvent as internal standard (CDCl₃ at 7.26 ppm and DMSO-*d*₆ at 2.50 ppm for ¹H NMR, and CDCl₃ at 77.16 ppm and DMSO-*d*₆ at 39.50 ppm for ¹³C NMR). TLC was carried out on pre-coated silica gel 60F₂₅₄ (Merck). Analytical HPLC was performed on a VWR-Hitachi apparatus ELITE LACHROM equipped with an L-2200 automated sample injector, a L-2130 pump, a L-2450 diode array detector and EZChrom software. Preparative HPLC was performed on a pump P110 (VWR), P314 Dual λ absorbance detector (VWR), P202 injector (VWR) and EZChrom software. Melting points were measured on a Buchi Melting Point M-560 apparatus and are not corrected.

4.2. 2-(1*H*-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)prop-2-enone (**20**)

To a solution of **19** (84 mg, 0.31 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂ and AcOH (3/1), acetic anhydride (35 μ L, 0.37 mmol) and tetramethyldiaminomethane (56 μ L, 0.43 mmol) were added. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and monitored by TLC. The reaction was dissolved with EtOAc and washed three times with saturated aqueous solution of NaHCO₃. The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na₂SO₄. After filtration, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (0–10% MeOH in CH₂Cl₂) to give a colorless oil (84 mg, 96%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.04 (1H; s), 7.84 (1H; m), 7.81 (2H; d; *J* = 8.5 Hz), 7.46 (2H; d; *J* = 8.5 Hz), 7.30 (3H; m), 6.27 (1H; d; *J* = 1.5 Hz), 6.06 (1H; d; *J* = 1.5 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 189.7, 143.7, 142.5, 140.5, 139.5, 134.3, 132.9, 131.0, 129.3, 124.1, 123.3, 120.9, 120.8, 110.6. HRMS-ESI (*m/z*): exact mass calculated for C₁₆H₁₂N₂OCl [M+H]⁺: 283.0633, found: 283.0637.

4.3. 2-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-1-(4-chlorophenyl)-3-(ethylthio)propanone (**21**)

To a solution of 2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-1-(4-chlorophenyl)ethanone (367 mg, 1.3 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂/AcOH

(3/1), anhydride acetic (0.15 mL, 1.56 mmol) and tetramethyldiaminomethane (0.23 mL, 1.56 mmol) were added. The reaction was stirred for 4 h at room temperature and monitored by TLC. Then, ethanethiol (57 μ L, 1.95 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 h at room temperature. The reaction was quenched with water and the product was extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na₂SO₄. After filtration, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (0–10% MeOH in CH₂Cl₂) to give a yellow oil (88 mg, 19%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.32 (1H; s), 8.10 (1H; s), 7.99 (2H; d; *J* = 8.6 Hz), 7.58 (2H; d; *J* = 8.6 Hz), 7.28 (2H; br s), 6.36 (1H; dd; *J* = 5.3, 9.5 Hz), 3.40 (2H; m), 2.47 (2H; m), 1.09 (3H; t; *J* = 7.4 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 193.9, 155.9, 152.6, 149.4, 140.3, 138.8, 133.3, 130.3, 129.1, 118.3, 57.5, 31.4, 24.9, 14.5. HRMS-ESI (*m/z*): exact mass calculated for C₁₆H₁₇N₅OSCl [M+H]⁺: 362.0837, found: 362.0877.

4.4. 2-(6-Amino-7*H*-purin-7-yl)-1-(4-chlorophenyl)-3-(ethylthio)propanone (**22**)

To a solution of 2-(6-amino-7*H*-purin-7-yl)-1-(4-chlorophenyl)ethanone (367 mg, 1.3 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂/AcOH (3/1), anhydride acetic (0.15 mL, 1.56 mmol) and tetramethyldiaminomethane (0.23 mL, 1.56 mmol) were added. The reaction was stirred for 4 h at room temperature and monitored by TLC. Then, ethanethiol (57 μ L, 1.95 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was quenched with water and the product was extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na₂SO₄. After filtration, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (0–10% MeOH in CH₂Cl₂) to give a yellow oil (316 mg, 68%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.58 (1H; s), 8.12 (1H; br s), 7.99 (1H; br s), 7.93 (2H; d; *J* = 8.6 Hz), 7.66 (1H; s), 7.54 (2H; d; *J* = 8.6 Hz), 6.42 (1H; dd; *J* = 5.5, 9.3 Hz), 3.49 (2H; m), 2.53 (2H; m), 1.08 (3H; t; *J* = 7.3 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 193.0, 154.2, 154.1, 150.7, 141.7, 141.0, 132.8, 130.6, 129.8, 120.8, 59.7, 33.2, 26.8, 14.6. HRMS-ESI (*m/z*): exact mass calculated for C₁₆H₁₇N₅OSCl [M+H]⁺: 362.0837, found: 362.0877.

4.5. Synthesis of compounds 23–28. General procedure for reaction of **20** with various thiol derivatives

To a solution of **20** (100 mg, 0.35 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) and acetic acid (1 mL) in a 5 mL reaction vessel, the appropriate thiol (0.53 mmol) was added. The reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was dissolved in EtOAc and washed three times with a saturated aqueous solution of K₂CO₃. The organic layers were combined and washed with brine and dried with Na₂SO₄. After filtration, the solvent was removed. The residue was purified by flash chromatography or HPLC.

4.6. 2-(1*H*-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-((furan-2-yl-methyl)thio)propanone (**23**)

The title compound was prepared according to the general procedure using furfurylmercaptan (53 μ L, 0.53 mmol) and was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH₂Cl₂) to give a colorless oil (108 mg, 73%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.98 (1H; s), 7.79 (1H; m), 7.76 (2H; d; *J* = 8.7 Hz), 7.38 (2H; m), 7.34 (2H; d; *J* = 8.7 Hz), 7.29 (2H; m), 6.34 (1H; m), 6.08 (1H; m), 5.69 (1H; dd; *J* = 6.5, 7.6 Hz), 3.55 (2H; m), 3.50 (1H; dd; *J* = 6.5, 15.0 Hz), 3.14 (1H; dd; *J* = 7.6, 15.0 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 192.8, 151.1, 143.8, 142.6, 142.2, 141.1, 132.8, 132.6,

129.9, 129.4, 123.7, 122.9, 120.9, 110.9, 109.9, 108.4, 59.1, 32.7, 29.3. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $C_{21}H_{18}N_2O_2S$ [M+H]⁺: 397.0772, found: 397.0765.

4.7. 2-(1*H*-Benzoimidazol-1-yl)-1-(4-chlorophenyl)-3-((3-nitrobenzyl)thio)propanone (24)

The title compound was prepared according to the general procedure using 2-nitrobenzylmercaptan (71 μ L, 0.53 mmol) and was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give a colorless oil (144 mg, 86%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.03 (1H; m), 8.02 (1H; s), 7.91 (1H; m), 7.80 (1H; m), 7.75 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.38 (1H; m), 7.35 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.30 (4H; m), 5.93 (1H; dd; J = 5.8, 7.9 Hz), 3.41 (2H; m), 3.32 (1H; dd; J = 5.8, 14.4 Hz), 3.11 (1H; dd; J = 7.9, 14.4 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 192.5, 148.3, 143.9, 142.2, 141.3, 139.6, 134.9, 132.53, 132.52, 129.8, 129.7, 129.6, 124.0, 123.7, 123.2, 122.5, 121.2, 109.7, 59.8, 36.3, 32.0. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $C_{23}H_{19}N_3O_3ClS$ [M+H]⁺: 452.0830, found: 452.0825.

4.8. 2-(1*H*-Benzimidazol-1-yl)-1-(4-chlorophenyl)-3-(cyclopentylthio)propanone (25)

The title compound was prepared according to the general procedure using 2-cyclopentylmercaptan (57 μ L, 0.53 mmol) and was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give a colorless oil (114 mg, 80%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.08 (1H; s), 7.85 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.79 (1H; m), 7.42 (1H; m), 7.38 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.30 (2H; m), 5.90 (1H; dd; J = 6.6, 7.5 Hz), 3.32 (1H; dd; J = 6.6, 14 Hz), 3.21 (1H; dd; J = 7.5, 14.0 Hz), 2.83 (1H; quint; J = 7.0 Hz), 1.84 (2H; m), 1.65 (2H; m), 1.48 (2H; m), 1.38 (2H; m). ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 192.9, 143.8, 142.1, 141.1, 132.9, 132.8, 129.9, 129.5, 123.8, 122.9, 120.9, 109.7, 59.4, 44.9, 33.8, 33.7, 33.1, 24.8, 24.7. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $C_{21}H_{22}N_2OS$ [M+H]⁺: 385.1136, found: 385.1138.

4.9. 2-(1*H*-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-((4-methoxybenzyl)thio)propanone (26)

The title compound was prepared according to the general procedure using paramethoxybenzylmercaptan (74 μ L, 0.53 mmol) and was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give a colorless oil (126 mg, 78%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.93 (1H; s), 7.78 (1H; m), 7.64 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.33 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.25 (3H; m), 7.10 (2H; d; J = 8.8 Hz), 6.83 (2H; d; J = 8.8 Hz), 5.54 (1H; dd; J = 6.6, 7.5 Hz), 3.80 (3H; s), 3.45 (2H; dd; J = 14.2, 14.3 Hz), 3.38 (1H; dd; J = 6.6, 14.3 Hz), 3.05 (1H; dd; J = 7.5, 14.2 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 192.8, 159.1, 143.8, 142.3, 141.0, 132.8, 132.7, 130.2, 129.9, 129.8, 129.4, 123.7, 122.9, 120.9, 114.3, 109.9, 59.2, 55.4, 36.9, 32.4. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $C_{24}H_{22}N_2O_2S$ [M+H]⁺: 437.1085, found: 437.1078.

4.10. 2-(1*H*-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-(pyrimidin-2-ylthio)propanone (27)

The title compound was prepared according to the general procedure using 2-mercaptopyrimidine (45 μ L, 0.53 mmol) and was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give an orange oil (70 mg, 52%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.52 (2H; d; J = 4.8 Hz), 8.02 (1H; s), 7.89 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.76 (1H; m), 7.48 (1H; m), 7.35 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.29 (1H; m), 7.04 (2H; t; J = 4.8 Hz), 6.36 (1H; t; J = 7.0 Hz), 4.03 (1H; dd; J = 7.0, 14.3 Hz), 3.80 (1H; dd; J = 7.0, 14.3 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 192.7, 157.6, 143.7, 142.0, 141.2, 133.1, 132.9, 130.1, 129.5, 123.8, 122.9, 120.8, 117.3, 109.9, 58.0, 32.2. HRMS-ESI

(m/z): exact mass calculated for $C_{20}H_{16}N_4OS$ [M+H]⁺: 395.0728, found: 395.0729.

4.11. 3-((1*H*-Imidazol-2-yl)thio)-2-(1*H*-benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)propanone (28)

The title compound was prepared according to the general procedure using 2-mercaptoimidazole (39 μ L, 0.53 mmol) and was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give an orange oil (106 mg, 75%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.12 (1H; s), 8.00 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.72 (1H; m), 7.61 (1H; m), 7.43 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.34 (2H; m), 7.01 (1H; dd; J = 6.0, 8.7 Hz), 6.42 (1H; d; J = 2.5 Hz), 6.12 (1H; d; J = 2.5 Hz), 4.95 (1H; dd; J = 6.0, 14.0 Hz), 4.45 (1H; dd; J = 8.7, 14.0 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 192.3, 161.3, 143.5, 142.1, 141.7, 133.0, 132.4, 130.3, 129.7, 124.2, 123.2, 120.8, 119.5, 114.5, 110.1, 55.9, 48.6. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $C_{19}H_{16}N_4OS$ [M+H]⁺: 383.0728, found: 383.0723.

4.12. 2-(1*H*-Benzimidazolyl)-3-(ethylthio)-1-(4-methoxyphenyl)propanone (29)

To a solution of 2-(1*H*-benzimidazolyl)-1-(4-methoxyphenyl)ethanone (50 mg, 0.19 mmol) in a mixture of CH_2Cl_2 /AcOH (3/1), anhydride acetic (2 μ L, 0.23 mmol) and tetramethyldiaminomethane (34 μ L, 0.23 mmol) were added. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and monitored by TLC. Then, ethanethiol (8 μ L, 0.28 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was dissolved with EtOAc (20 mL) and washed three times (3 \times 20 mL) with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$. The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was removed, the residue was purified by preparative HPLC with a C-18 column and a linear gradient (5% acetonitrile to 100% acetonitrile/ H_2O with 0.02% TEA) to give a yellow oil (29 mg, 45%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.11 (1H; s), 7.92 (2H; d; J = 8.8 Hz), 7.78 (1H; m), 7.47 (1H; m), 7.30 (2H; m), 6.85 (2H; d; J = 8.8 Hz), 5.91 (1H; dd; J = 6.4, 7.6 Hz), 3.80 (3H; s), 3.42 (1H; dd; J = 6.4, 14.0 Hz), 3.23 (1H; dd; J = 7.6, 14.0 Hz), 2.30 (2H; m), 1.10 (3H; t; J = 7.3 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 192.0, 164.5, 143.7, 142.2, 132.9, 130.9, 127.4, 123.5, 122.6, 120.7, 114.3, 109.7, 58.9, 55.6, 33.1, 27.0, 14.6. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $C_{19}H_{21}N_2O_2S$ [M+H]⁺: 341.1318, found: 341.1317.

4.13. 2-(1*H*-Benzimidazolyl)-1-(3,4-dichlorophenyl)-3-(ethylthio)propanone (30)

To a solution of 2-(1*H*-benzimidazolyl)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethanone (50 mg, 0.17 mmol) in a mixture of CH_2Cl_2 /AcOH (3/1), anhydride acetic (2 μ L, 0.21 mmol) and tetramethyldiaminomethane (34 μ L, 0.21 mmol) were added. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and monitored by TLC. Then, ethanethiol (8 μ L, 0.26 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was dissolved with EtOAc (20 mL) and washed three times (3 \times 20 mL) with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$. The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was removed and the residue was purified by preparative HPLC with a C-18 column and a linear gradient (5% acetonitrile to 100% acetonitrile/ H_2O with 0.02% TEA) to give a yellow oil (45 mg, 73%). ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.07 (1H; s), 8.01 (1H; d; J = 2.1 Hz), 7.79 (1H; m), 7.68 (1H; dd; J = 2.1, 8.3 Hz), 7.46 (1H; d; J = 8.3 Hz), 7.41 (1H; m), 7.30 (2H; m), 5.92 (1H; dd; J = 6.4, 7.4 Hz), 3.41 (1H; dd; J = 6.4, 14.0 Hz), 3.22 (1H; dd; J = 7.4, 14.0 Hz), 2.31 (2H; m), 1.10 (3H; t; J = 7.4 Hz). ¹³C

NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 192.1, 143.8, 142.0, 139.3, 134.1, 134.0, 132.7, 131.3, 130.6, 127.3, 123.9, 123.1, 121.1, 109.6, 59.6, 32.8, 27.2, 14.7. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OSCl}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 379.0433, found: 379.0416.

4.14. 2-(1H-Benzimidazolyl)-3-(ethylthio)-1-phenylpropanone (31)

To a solution of 2-(1H-benzimidazolyl)-1-phenylethanone (50 mg, 0.2 mmol) in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}$ (3/1), anhydride acetic (25 μL , 0.26 mmol) and tetramethyldiaminomethane (4 μL , 0.26 mmol) were added. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and monitored by TLC. Then, ethanethiol (9.5 μL , 0.32 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was dissolved with EtOAc (20 mL) and washed three times (3×20 mL) with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 . The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give a yellow oil (60 mg, 91%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.11 (1H; s), 7.92 (2H; m), 7.79 (1H; m), 7.55 (1H; t; $J = 1.3$, 7.3 Hz), 7.47 (1H; m), 7.41 (2H; m), 7.29 (2H; m), 6.02 (1H; dd; $J = 6.3$, 7.8 Hz), 3.45 (1H; dd; $J = 6.3$, 14.0 Hz), 3.21 (1H; dd; $J = 7.8$, 14.0 Hz), 2.31 (2H; m), 1.11 (3H; t; $J = 7.4$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 193.9, 143.8, 142.3, 134.6, 134.5, 132.9, 129.2, 128.6, 123.7, 122.8, 120.9, 109.8, 59.4, 33.1, 27.1, 14.7. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OS}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 311.1213, found: 311.1213.

4.15. 2-(1H-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-ethoxypropanone (32)

To a solution of **20** (100 mg, 0.37 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) and acetic acid (1 mL), sodium ethoxide (38 mg, 0.56 mmol) was added. The reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was dissolved with EtOAc (20 mL) and washed three times (3×20 mL) with a saturated aqueous solution of K_2CO_3 . The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give a white powder (28 mg, 24%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.21 (1H; s), 7.88 (1H; d; $J = 8.7$ Hz), 7.82 (1H; m), 7.42 (2H; d; $J = 8.7$ Hz), 7.39 (1H; m), 7.30 (2H; m), 6.01 (1H; dd; $J = 5.3$, 6.3 Hz), 4.22 (1H; dd; $J = 5.3$, 10.0 Hz), 4.06 (1H; dd; $J = 6.3$, 10.0 Hz), 3.50 (1H; m), 3.43 (1H; m), 1.11 (3H; t; $J = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 192.8, 143.6, 142.8, 140.9, 133.3, 133.2, 129.9, 129.5, 123.5, 122.7, 120.8, 109.4, 69.7, 67.5, 59.2, 14.9. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 329.1051, found: 329.1060.

4.16. 2-(6-Amino-7H-purin-7-yl)-1-(4-chlorophenyl)-3-ethoxypropanone (33)

To a solution of 2-(6-amino-7H-purin-7-yl)-1-(4-chlorophenyl)ethanone (100 mg, 0.35 mmol) in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}$ (3/1), anhydride acetic (40 μL , 0.42 mmol) and tetramethyldiaminomethane (62 μL , 0.42 mmol) were added. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and monitored by TLC. Then, sodium ethoxide (36 mg, 0.53 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was dissolved with EtOAc (20 mL) and washed three times (3×20 mL) with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 . The organic layers were combined, washed with brine and dried with Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was removed, the residue was purified by preparative HPLC with a C-18 column and a linear gradient (5% acetonitrile to 100% acetonitrile/ H_2O with 0.02% TEA)

to give a yellow powder (15 mg, 13%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.47 (1H; s), 8.08 (1H; br s), 8.02 (2H; d; $J = 8.8$ Hz), 7.98 (1H; br s), 7.65 (1H; s), 7.60 (2H; d; $J = 8.8$ Hz), 6.70 (1H; m), 4.27 (2H; m), 3.51 (2H; m), 0.98 (3H; t; $J = 7$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 188.9, 155.2, 152.5, 148.9, 143.1, 140.4, 138.5, 134.4, 131.5, 129.1, 125.6, 56.0, 48.6, 18.6. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 346.1318, found: 346.1317.

4.17. (Z)-2-(1H-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)-3-(dimethylamino)prop-2-enone (34)

To a solution of **19** (50 mg, 0.19 mmol) in 3 mL of dry DCM, Brederick reagent (78 μL , 0.38 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with EtOAc (20 mL) and washed three times with water (3×20 mL), brine and the organic phases were dried with Na_2SO_4 . After evaporation of the solvent, the title compound was purified by flash chromatography (0–100% EtOAc in cyclohexane) to give a colorless oil (29 mg, 48%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.76 (3H; m), 7.29 (5H; m), 7.19 (2H; m), 3.11 (3H; br s), 2.22 (3H; br s). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 189.6, 150.8, 145.9, 143.1, 137.7, 136.9, 136.6, 128.9, 128.5, 124.1, 122.8, 120.7, 110.4, 105.1, 47.9, 37.0. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ON}_3\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 326.1055, found: 326.1056.

4.18. (2Z,4E)-2-(1H-Benzimidazolyl)-1-(4-chlorophenyl)-5-phenylpenta-2,4-dienone (35)

To a solution of **19** (50 mg, 0.19 mmol) in 2 mL of benzene, cinnamaldehyde (29 μL , 0.23 mmol) and potassium *tert*-butoxide (26 mg, 0.23 mmol) were added and the mixture was stirred for 4 h at 80 °C. The reaction was diluted with toluene (15 mL) and washed three times with H_2O (3×15 mL), brine and the organic phases were dried with Na_2SO_4 . After filtration of the solvent, the title compound was purified by flash chromatography (0–5% MeOH in CH_2Cl_2) to give a yellow oil (59 mg, 84%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.99 (1H; s), 7.89 (1H; m), 7.67 (2H; d; $J = 8.5$ Hz), 7.49 (1H; m), 7.45 (2H; d; $J = 8.5$ Hz), 7.31 (7H; m), 7.21 (1H; m), 7.15 (1H; m), 6.69 (1H; dd; $J = 15.5$, 11.2 Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 190.1, 145.4, 143.8, 143.4, 141.5, 139.3, 135.6, 135.2, 134.3, 130.6, 130.5, 130.4, 129.2, 129.1, 127.9, 124.1, 123.1, 121.3, 120.9, 110.6. HRMS-ESI (m/z): exact mass calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ON}_2\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 385.1102, found: 385.1099.

4.19. Biological evaluation

4.19.1. DNMT3A assay

DNMT3A enzyme inhibition was adapted from the restriction-based fluorescence assay protocol described by Ceccaldi et al.¹¹ Briefly, a 5'-labeled biotin oligonucleotide was hybridized to its complementary strand labeled with 6-carboxyfluorescein at the 3'-end and transferred into a 384-well microplate (black Optiplates; PerkinElmer) pre-coated with avidin. The duplex contains a unique CpG site overlapping with a restriction site of a methylation-sensitive restriction enzyme. The human C-terminal DNMT3A (a.a. 623–908), produced as described,¹¹ was added to each well (200 ng/well) and mixed with the chemical compounds at the desired concentration and freshly prepared SAM (20 μM final concentration) to start the reaction in a total volume of 50 μL . After 1 h incubation at 37 °C, each well was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 and NaCl (500 mM) and three more times with phosphate-buffered saline Tween-20 (PBST). Specific fluorescence signals were detected with the methylation-sensitive restriction enzyme HpyCH4IV (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) as

described, and measured on a PerkinElmer Envision detector. The percent inhibition was calculated according to Eq. 1, where X is the signal determined in the absence of the inhibitor and Y is the signal obtained in the presence of the inhibitor.

$$\% \text{ inh.} = [(X - Y)/X] \times 100 \quad (1)$$

The ligand concentration at which 50% inhibition of enzyme activity is observed (EC_{50}) was determined by analysis of a concentration range of the test compounds in triplicates. Nonlinear regression fittings with sigmoidal dose–response (variable slope) were performed with Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The standard error is reported.

4.19.2. DNMT1 assay

His-DNMT1 (182 kDa, human) was cloned, expressed and purified as described by Lee et al.¹⁷ The assays were performed as described in the literature.¹⁸ The reaction was performed in a total reaction volume of 10 mL in low-volume nonbinding surface (NBSM) 384-well microplates (Corning Inc.), containing test compound (up to 1% DMSO), 1 mM of S-adenosyl-L-methionine (SAM)/[methyl-³H]SAM (3 TBqmmol^{−1}, PerkinElmer) mix in a ratio of 3:1 (isotopic dilution 1:3), 0.3 mM of biotinylated hemimethylated DNA duplex and 90 nM of DNMT1 in methylation buffer (20 mM HEPES (pH 7.2), 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 25 mg/mL of bovine serum albumin). The reaction was incubated at 37 °C for 2 h, then an aliquot (8 µL) was transferred into a streptavidin 96-well scintillant-coated Flash Plate (PerkinElmer) containing 20 mM S-adenosyl-homocysteine (SAH; 190 mL) in 50 mM Tris–HCl (pH 7.4). The Flash Plate was agitated at RT for 1 h, washed three times with 200 mL of 0.05% TweenR-20 in 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), and read in 200 mL of 50 mM Tris–HCl (pH 7.4) on Top Count NX (PerkinElmer).

4.19.3. Antiproliferative activity

KG-1 human leukemia cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultivated in RPMI-1640 medium containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and L-glutamine (BE12-115F, Lonza, France) supplemented with 20% fetal calf serum (Lonza, France), at 37 °C and under 5% CO₂. Cells (2×10^4) were seeded at day 0 in a 96-well plate. HCT116 human colon cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultivated in MEM glutamax medium containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and L-glutamine (BE12-115F, Lonza, France) supplemented with 10% SVF (Lonza, France), at 37 °C and under 5% CO₂. Cells ($1.5 \cdot 10^3$) were seeded at day 0 in a 96-well plate. Solutions of test compound, stored at −20 °C as a 10^{-2} M stock solution in 100% DMSO, were freshly prepared by dilution on day 1 in cell medium. Cells were treated with test compound solutions at a dose range from 3.2 nM to 10 µM. Treatment was repeated on days 2 and 3, and on day 4, cell viability was assessed using the ATPLite kit (ATPLite 1step Luminescence Assay System, ref: 3016739, PerkinElmer), following the manufacturer's instructions. Raw data

were analyzed with Prism 4.03 to generate EC_{50} values corresponding to the compound concentration required to cause a 50% decrease in cell viability as compared with untreated controls. The values presented are the mean of at least two independent experiments.

Acknowledgments

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) [ATIP]; and Région Midi Pyrénées France [Equipe d'Excellence and FEDER CNRS/Région Midi Pyrénées] to P.B.A; by grant n°FDT20140930846 from Fondation pour la Recherche Médicale to A.E. We thank Yannick Aussagues, François Sautel and Georges Massiot for helpful discussions, and Philippe Vergnes for precious technical assistance. Screening experiments were carried out on the 'Plateforme Intégrée de Criblage de Toulouse' (PICT, IBISA, France) facilities.

Supplementary data

Supplementary data (NMR spectra and further information are in the supplementary) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.066>.

References and notes

- Pandiyani, K.; You, J. S.; Yang, X.; Dai, C.; Zhou, X. J.; Baylin, S. B.; Jones, P. A.; Liang, G. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 3973.
- Subramaniam, D.; Thombre, R.; Dhar, A.; Anant, S. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 80.
- Jurkowska, R. Z.; Jurkowski, T. P.; Jeltsch, A. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 206.
- Jia, D.; Jurkowska, R. Z.; Zhang, X.; Jeltsch, A.; Cheng, X. *Nature* **2007**, *449*, 248.
- Gros, C.; Fahy, J.; Halby, L.; Dufau, I.; Erdmann, A.; Gregoire, J. M.; Ausseil, F.; Vispe, S.; Arimondo, P. B. *Biochimie* **2012**, *94*, 2280.
- Lund, K.; Cole, J. J.; VanderKraats, N. D.; McBryan, T.; Pchelintsev, N. A.; Clark, W.; Copland, M.; Edwards, J. R.; Adams, P. D. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 406.
- Erdmann, A.; Halby, L.; Fahy, J.; Arimondo, P. B. *J. Med. Chem.* **2014**.
- Datta, J.; Ghoshal, K.; Denny, W. A.; Gamage, S. A.; Brooke, D. G.; Phiasivongsa, P.; Redkar, S.; Jacob, S. T. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4277.
- Brueckner, B.; Garcia Boy, R.; Siedlecki, P.; Musch, T.; Kliem, H. C.; Zielenkiewicz, P.; Suhai, S.; Wiessler, M.; Lyko, F. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6305.
- Ceccaldi, A.; Rajavelu, A.; Champion, C.; Rampon, C.; Jurkowska, R.; Jankevicius, G.; Senamaud-Beaufort, C.; Ponger, L.; Gagey, N.; Ali, H. D.; Tost, J.; Vríz, S.; Ros, S.; Dauzonne, D.; Jeltsch, A.; Guianvarc'h, D.; Arimondo, P. B. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1337.
- Ceccaldi, A.; Rajavelu, A.; Ragozin, S.; Senamaud-Beaufort, C.; Bashtrykov, P.; Testa, N.; Dali-Ali, H.; Maulay-Bailly, C.; Amand, S.; Guianvarc'h, D.; Jeltsch, A.; Arimondo, P. B. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 543.
- Gros, C.; Fleury, L.; Nahoum, V.; Faux, C.; Valente, S.; Labella, D.; Cantagrel, F.; Rilova, E.; Bouhrel, M. A.; David-Cordonnier, M.; Dufau, I.; Ausseil, F.; Mai, A.; Mourey, L.; Lacroix, L.; Arimondo, P. B. *J. Biol. Chem.* **2014**.
- Jones, P. A.; Liang, G. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 805.
- Song, J.; Rechko, O.; Bestor, T. H.; Patel, D. J. *Science* **2011**, *331*, 1036.
- Suzuki, T.; Tanaka, R.; Hamada, S.; Nakagawa, H.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1124.
- Yang, J.; Lior-Hoffmann, L.; Wang, S.; Zhang, Y.; Broyde, S. *Biochemistry* **2013**, *52*, 2828.
- Lee, B. H.; Yegnasubramanian, S.; Lin, X.; Nelson, W. G. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40749.
- Gros, C.; Chauvigne, L.; Poulet, A.; Menon, Y.; Ausseil, F.; Dufau, I.; Arimondo, P. B. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e185.

Annexe A.4.

Identification and optimisation of hydrazone-gallate derivatives as specific inhibitors of DNA methyltransferase 3A.

(2015) soumis à *Future medicinal chemistry*.

Alexandre Erdmann, Yoann Menon, Christina Gros, Veronique Masson, Yannick Aussagues, Frederic Ausseil, Natacha Novosad, Philippe Schambel, Michel Baltas and Paola B. Arimondo.

Résumé de l'article

Le criblage des chimiothèques sur l'inhibition de la DNMT3A ont mené à une famille de dérivés hydrazones d'aldéhyde gallique, que les chimistes du laboratoire ont optimisé pour inhiber sélectivement DNMT3A par rapport à DNMT1. Une étude de SAR à partir des composés criblés a permis d'identifier le composé **6** comme hit avec une EC50 de 7,3 μM . Le travail d'optimisation du pharmacophore a mis en évidence une amélioration de l'activité pour le composé **17** qui a une EC50 d'inhibition de DNMT3A de 1,6 μM .

Ce composé **17** montre une capacité à ré-exprimer le gène rapporteur CMV-luc à 5 μM et ne présente pas d'effet cytotoxique à 10 μM sur trois lignées: KG-1 (leucémie), MBA-MD-231 (cancer du sein) et HCT116 (cancer du colon). Sa capacité à inhiber sélectivement la DNMT3A par rapport à DNMT1 est supportée par une hypothèse de modélisation qui met en évidence son interaction avec des résidus spécifiques de DNMT3A.

Identification and optimization of hydrazone-gallate derivatives as specific inhibitors of DNA methyltransferase 3A

Alexandre Erdmann[‡], Yoann Menon[‡], Christina Gros[‡], Véronique Masson[‡], Yannick Aussagues[‡], Frédéric Ausseil[‡], Natacha Novosad[‡], Philippe Schambel[&], Michel Baltas^{£,§*} and Paola B. Arimondo^{‡*}

[‡] Unité de Service et de Recherche CNRS-Pierre Fabre n°3388, ETaC, CRDPF, 31100 Toulouse, France.

[#] Laboratoire de synthèse physico-chimique de molécules d'intérêt biologique, UMR5068, CNRS, 31000 Toulouse, France.

[&] Institut de Recherche Pierre Fabre, 81106 Castres, France.

[£] CNRS; Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, SPCMIB, UMR-5068; 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

[§] Université de Toulouse; UPS; Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, SPCMIB; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

ABSTRACT: DNA methylation is the most studied epigenetic event. Since the methylation profile of the genome is widely modified in cancer cells, DNA methyltransferases are the target of new anticancer therapies. Nucleosidic inhibitors suffer from toxicity and chemical stability, while non-nucleosidic inhibitors lack potency. Here, we found a novel DNMT inhibitor scaffold by enzymatic screening and structure activity relationship studies. The optimization studies led to an inhibitor containing three fragments: a gallate moiety, a hydrazone linker and a benzothiazole moiety. Interestingly, the compound inhibits DNMT3A with micromolar potency ($EC_{50} = 1.6 \mu M$) and does not inhibit DNMT1; this DNMT3A selectivity is supported by a docking study. Finally, the compound reactivates a reporter gene in leukaemia KG-1 cells.

BACKGROUND: The epigenetic field is one of the most promising areas of study for novel anticancer therapy. In cancer cells, the epigenetic landscape is altered enhancing cancer aggressiveness.[1-3] Epigenetic processes are involved in cancer dynamics to provide long-term stability to tumour cells. Histone modifications and DNA methylation are the major epigenetics events controlling the chromatin state and influencing gene expression.[4] In cancers, tumour suppressor genes are largely repressed by hypermethylation of their promoters. Since DNA methylation is reversible, inhibition of the DNA methyltransferases (DNMT), the enzymes responsible of DNA methylation, is a promising strategy to stop cancer progression by reactivating tumour suppressor genes.[5-7] Three different active isoforms of DNMT exist: DNMT1, 3A and 3B. DNMT1 is responsible of DNA methylation maintenance by acting on hemi-methylated DNA, and DNMT3A and 3B are *de novo* DNA methyltransferases, which introduce methyl groups on unmethylated DNA.[8, 9] DNMTs catalyse methylation on position 5 of a cytosine base in a CpG context in the DNA. This inspired a large number of studies to design DNMT inhibitors by mimicking the endogenous

cytosine substrate. 5-Azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine are approved by the FDA against myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukaemia and chronic myelomonocytic leukaemia.[10] However, these drugs suffer from weak bioavailability and chemical instability. Moreover, their inhibition mechanism includes incorporation into DNA replacing all cytosines and leading to DNA breaks. In order to bypass these problems, new non-nucleoside inhibitors of DNMT are designed. Several non-nucleoside inhibitors were conceived but most are poorly efficient and none entered preclinical studies.[11] Most of them also lack the strong potency necessary to induce demethylation of tumour suppressor genes. Additionally, the design of selective inhibitors of one isoform of DNMTs, as type 1 vs. type 3, is a promising strategy to chemical probes to understand the role of each DNMT isoform and to decrease the toxicity.

RESULTS: Here we focused on the design of new non-nucleosidic inhibitors of DNMT. A panel of 29 compounds containing a hydrazone chain was screened in an enzymatic assay to reveal their capacity to inhibit DNMT3A, as described previously.[12] Six compounds retained our attention and are reported in Table 1 together with their capacity to inhibit DNMT3A, while the structure of all compounds is shown in Supplementary Table 1.

Table 1. Structure and DNMT3A inhibition activities of compounds 1 to 6 at 32 and 10 μ M.

Cpd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	% inhibition DNMT3A	
						32 μ M	10 μ M
1		H	OH	OH	H	6	0
2		OMe	OH	OH	H	62	25
3		H	OH	OH	H	17	12
4		OMe	OH	OH	H	64	31
5		H	OH	OH	H	21	16
6		OMe	OH	OH	H	82	70

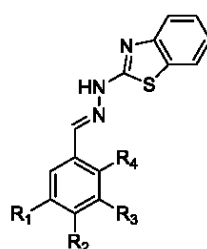
Compounds **2**, **4** and **6** indicate the important role of the methoxy group for the R₂ substitution when compared to **1**, **3** and **5**. By comparing **6** to **2** and **4**, we learned that the benzothiazole substitution in position R₁ was the most efficient for the inhibition of

DNMT3A, with 70 % of inhibition at 10 μ M and an IC_{50} of 7.3 ± 2.0 μ M. Starting from compound **6**, we modulated the three fragments of the molecule (Figure 1) to carry out structure activity relationships: (A) the phenolic moiety, (B) the benzothiazole moiety and (C) the hydrazone linker.

Insert Figure 1 here

First we modulated fragment A by varying the position of the methoxy and hydroxyl groups. Twelve new compounds were synthesized (Table 2), according to the previously described condensation of the corresponding aldehyde on the commercially available hydrazinobenzothiazole.[13]

Table 2. Chemical structures of the compounds synthesized to explore fragment A.



Cpd	R1	R2	R3	R4	% inhibition DNMT3A (10 μ M)
7	H	H	H	H	0
8	H	H	OMe	H	2
9	H	OMe	H	H	0
10	H	OMe	H	OMe	0
11	OMe	H	OMe	H	0
12	H	OMe	OMe	H	0
13	OMe	H	H	OMe	2
14	OMe	OMe	OH	H	0
15	OMe	OH	OMe	H	0
16	OMe	OMe	OMe	H	0
17	OH	OH	OH	H	83
18	Cl	H	H	OH	0

Compounds **7** to **13**, lacking hydroxyl function and containing one or two methoxy groups, were totally inactive, as also the fully trimethoxy substituted derivative **16**. The presence of two methoxy and only one hydroxyl (compounds **14** and **15**) was also deleterious for the inhibition activity. This is also the case when the hydroxyl (or methoxy group) is positioned in alpha to the hydrazone function (compounds **18** and **10**). Finally compound **17** containing the fully demethylated gallate moiety showed an improvement of the inhibition activity with an EC_{50} of 1.6 ± 0.6 μ M against human DNMT3A. When the gallate moiety is replaced by a different motif as in compound **18** all the activity is lost.

Second, we explored fragment B, the benzothiazole part (Table 3).

Table 3. Exploring the fragment B: chemical structures and EC₅₀ against DNMT3A. The mean value of at least two experiments and the standard error are shown.

Cpd	R	EC ₅₀ DNMT3A (μM)
19		2.1 ± 0.8
20		2.2 ± 0.7
21		1.1 ± 0.3
22		1.9 ± 0.6

The condensation of the trihydroxybenzaldehyde with various hydrazines was used to explore the size of the heterocycle upon use of commercial monocyclic heterocycles, such as trifluoromethylpyrimidine (**19**) and dihydroimidazole (**20**); bicyclic heterocycles, such as quinoline (**21**), and the size of the substituent by using voluminous groups (**22**). Similar potencies were obtained to compounds **17**.

Next, we then wondered if an amide linker (fragment C) instead of an hydrazone might have an impact on the activity. In that respect, a different synthesis pathway was used (Scheme 1).

Insert scheme 1 here.

The acylation of trimethoxyaniline **23** with benzothiazole carbonyl chloride in the presence of trimethylamine provided the intermediate **24** in moderate yield (34 %). Then, treatment of **24** with boron tribromide gave the desired product **25**. Only 17 % yield of **25** was obtained due to slow dissociation of the boron complex formed with the gallate derivatives. In the enzymatic assay against DNMT3A, compound **25** showed an EC₅₀ of 1.6 ± 0.3 μM, comparable to compound **17** suggesting that the hydrazone linker is not essential to the activity. Since compounds **21**, **22** and **25** did not show an improvement of the inhibition activity compared to **17**, we further studied the biological activities of this latter.

Compound **17** was tested whether it inhibits human DNMT1.[14] Interestingly, **17** shows 30 % of inhibition of DNMT1 at 100 μM, thus less potent than the reference pan-DNMT inhibitor SGI1027[15] showing 100 % of inhibition of DNMT1 at 100 μM. These results revealed that **17** can be considered a selective inhibitor of DNMT3A. To get some insights into this selectivity, the compound was docked in the active pocket of the crystal structure of

catalytic murine Dnmt3A (PDB = 2QRV).[16] Figure 2 shows compound **17** docked in the catalytic pocket of the enzyme and the amino acids involved in the interaction with the compound are highlighted.

Insert Figure 2 here.

The docking of **17** showed the formation of hydrogen bonds between certain amino acids of the enzyme pocket and the hydrazone function as well as the trihydroxyl substituents. Interestingly, methylation of the hydroxyl functions led to steric clashes with the amino acids and, consequently, low affinity of the trimethylated scaffold for the catalytic pocket, in agreement with the biological findings (Table 2). Moreover, the aromatic ring of the gallate moiety interacted with Trp889 in brown by π -stacking (highlight by brown double arrow) and the benzothiazole part increased the affinity for the enzyme by π -alkyl interaction (highlight by green double arrow) with Arg887 in green. These observations comfort the biological data that compound **17** strongly binds in the catalytic pocket of Dnmt3A. Superimposition of the structure of Dnmt3A with the crystal structure of murine Dnmt1 (PDB = 4DA4)[17] by alignment of the endogenous SAH substrate present in the two structures showed some differences for the catalytic pocket of the two enzymes. Arg887 and Trp889 of Dnmt3A are replaced by Leu1154 and Asp1580 in Dnmt1, respectively. These two modifications influence the physical and chemical properties of the pocket, implying that compound **17** cannot anymore positively interact with the catalytic site and thus possibly explaining the decrease of inhibition of Dnmt1 by the compound.

Finally, we tested whether it is able to reactivate a gene silenced by hypermethylation of its promoter using a reporter system integrated in leukemia KG-1 cells, in which the luciferase gene is under the control of a methylated CMV promoter.[18, 19] In this reporter gene system, upon addition of demethylation agents, as reference inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC), an induction of the luciferase signal is observed (Table 4).

Table 4. Cellular activities of compound 17. Cytotoxicity against leukaemia KG-1, breast cancer MDA-MB-231 and colon cancer HCT116 cell lines and reactivation of the luciferase expression of the CMV-luc gene construct in KG-1 cells.

Cpd	Luciferase expression Fold induction				% growth inhibition at 10 μ M		
	10 μ M	5 μ M	1 μ M	0.1 μ M	KG- 1	MDA- MB- 231	HCT116
5azadC	14.6 \pm 2.6	14.9 \pm 2.6	16.5 \pm 2.9	7.9 \pm 2.4	61	35	43
17	5.8 \pm 1.5	4.7 \pm 1.3	1.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	40	33	22

Compound **17** was able to reactivate the luciferase gene.[11] The compounds were also evaluated for their cytotoxicity on three tumour cell lines (leukaemia KG-1, breast cancer MDA-MB-231 and colon cancer HCT116) three days after treatment, showing an $EC_{50} > 10$

μM on all cell lines (Table 4). This finding indicated that the specific targeting of DNMT3A was able to reactivate gene expression but without marked cytotoxicity. Noteworthy, molecules containing the catechol moiety, such as epigallocatechin-3-gallate (EGCG), are known to inhibit cancer cells proliferation through induction of cell cycle arrest and disruption of signalling pathways [20] by acting on multiple targets. The lack of cytotoxicity on three cancer cell lines for compound **17** - a selective inhibitor of DNMT3A - goes against the hypothesis that the compound can act on multiple targets. Interestingly, such compound, selective of DNMT3A, can be used as chemical probe to explore the specific role of DNMT3A in cancer cells, once its potency increased.

CONCLUSIONS: In an enzymatic screening, a new structure was identified as potent and selective inhibitor of DNMT3A. Docking studies revealed that compound **17** was stabilized in the catalytic pocket by interacting with Trp889 and Arg887, amino acids that are absent in DNMT1, supporting its DNMT3A selectivity. The present work resulted in the synthesis of a micromolar range inhibitor of DNMT3A able to reactive gene expression in a luciferase model system, without cytotoxicity after three days of treatment. The results are encouraging to further investigate the potential anticancer and gene expression reprogramming potential of future derivatives of compound **17**. Work is undergoing for further modulation of fragments B and C.

Supporting Information Available. Synthetic procedures, characterization data, docking methods and biological assay information.

Corresponding Author

* Paola B. Arimondo, Unité de Service et de Recherche, CNRS-Pierre Fabre n°3388 ETaC, CRDPF, 3 avenue H. Curien, F-31035 Toulouse cedex 01, France. Phone +33-5-34506492; fax +33-5-34503492; email: paola.arimondo@etac.cnrs.fr. Michel Baltas, CNRS-UPS, Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, SPCMIB, UMR-5068; 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France. Phone +33-5-61556289; fax -33-5-61556011; email: baltas@chimie.ups-tlse.fr.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) [ATIP to P.B.A.]; and Région Midi Pyrenées [Equipe d'Excellence and FEDER CNRS/Région Midi Pyrenées to P.B.A.]; by grant n°FDT20140930846 from Fondation pour la Recherche Médicale [to A.E.].

Acknowledgement

The authors thank the CNRS, IRPF and Région Midi Pyrénées for financial support. We thank Audrey Cannac, Christophe Long, Ludovic Halby and Georges Massiot for helpful discussions.

Abbreviations

DNMT, DNA methyltransferases; AdoMet, S-adenosyl-L-methionine; TEA, triethylamine; RT, room temperature.

References

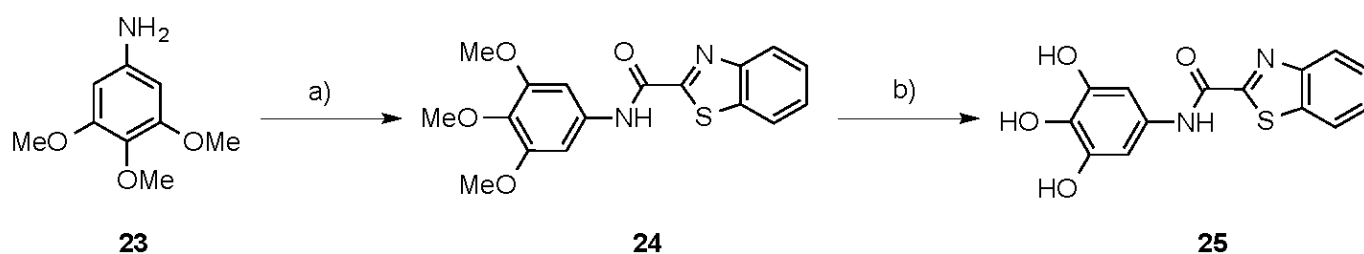
1. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31(1), 27-36 (2010).
2. Wee S, Dhanak D, Li H *et al.* Targeting epigenetic regulators for cancer therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1309 30-36 (2014).
3. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol. Cell* 54(5), 716-727 (2014).
4. Pandiyan K, You JS, Yang X *et al.* Functional DNA demethylation is accompanied by chromatin accessibility. *Nucleic Acids Res.* 41(7), 3973-3985 (2013).
5. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol* 4 80 (2014).
6. Gros C, Fahy J, Halby L *et al.* DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie* 94(11), 2280-2296 (2012).
7. Taberlay PC, Jones PA. DNA methylation and cancer. *Prog Drug Res* 67 1-23 (2011).
8. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBioChem* 12(2), 206-222 (2011).
9. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem. Sci.* 39(7), 310-318 (2014).
10. Fahy J, Jeltsch A, Arimondo PB. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. *Expert Opin. Ther. Pat.* 22(12), 1427-1442 (2012).
11. Erdmann A, Halby L, Fahy J, Arimondo PB. Targeting DNA methylation with small molecules: what's next? *J. Med. Chem.* 58(6), 2569-2583 (2015).
12. Ceccaldi A, Rajavelu A, Ragozin S *et al.* Identification of novel inhibitors of DNA methylation by screening of a chemical library. *ACS Chem. Biol.* 8(3), 543-548 (2013).
13. Belkheiri N, Bouguerne B, Bedos-Belval F *et al.* Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *Eur. J. Med. Chem.* 45(7), 3019-3026 (2010).
14. Gros C, Chauvigne L, Poulet A *et al.* Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies. *Nucleic Acids Res.* 41(19), e185 (2013).
15. Gros C, Fleury L, Nahoum V *et al.* New Insights on the Mechanism of Quinoline-based DNA Methyltransferase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M114.594671 (2014).
16. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449(7159), 248-251 (2007).

17. Song J, Rechko O, Bestor TH, Patel DJ. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science* 331(6020), 1036-1040 (2011).
18. Rilova E, Erdmann A, Gros C *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 4-amino-N- (4-aminophenyl)benzamide analogues of quinoline-based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation. *ChemMedChem* 9(3), 590-601 (2014).
19. Rotili D, Tarantino D, Marrocco B *et al.* Properly substituted analogues of BIX-01294 lose inhibition of G9a histone methyltransferase and gain selective anti-DNA methyltransferase 3A activity. *PLoS One* 9(5), e96941 (2014).
20. Yu Y, Deng Y, Lu BM, Liu YX, Li J, Bao JK. Green tea catechins: a fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis* 19(1), 1-18 (2014).

Figure 1. The hit compound was fragmented in A (red), in B (green) and in C (blue) for SAR studies. Every fragment was modified by chemical synthesis in order to optimize the potency.

Figure 2. Binding hypothesis for compound **17** (in blue) in the catalytic pocket of Dnmt3a (PDB = 2QRV). The docking model suggests that the benzothiazolyl moiety establish π -alkyl interaction with ARG887 (in green) and the trihydroxy phenyl ring establish π -stacking interaction with TRP889 (in brown). The complex is stabilized mainly by the formation of multiple hydrogen bonds between hydroxyl groups in a galloyl disposition and deep amino acids (as shown).

Scheme 1. Synthesis pathway to compound **25** containing an amide linker. a) Benzothiazole-2-carbonyl chloride, TEA, RT, 4h, 34%. b) BBr₃, CH₂Cl₂, RT, 12h, 17%.



Scheme 1

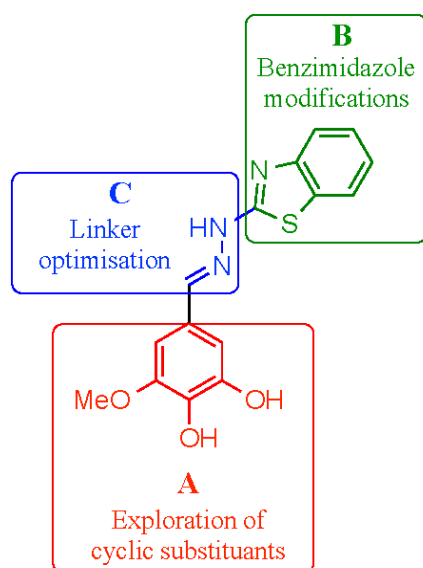


Figure 1

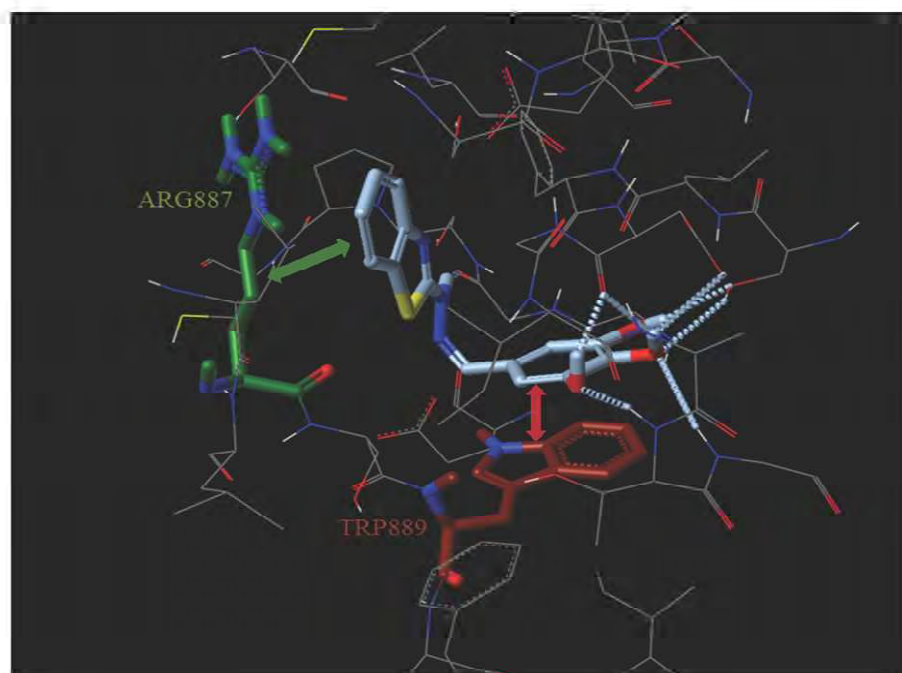


Figure 2



Références

Références

- Adwan L and Zawia NH. Epigenetics: A novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* 2013; 139(1), 41-50.
- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013 16; 2, e71.
- Ahn JS, Kim HJ, Kim YK *et al.* DNMT3A R882 Mutation with FLT3-ITD Positivity Is an Extremely Poor Prognostic Factor in Patients with Normal-Karyotype Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; [Epub ahead of print].
- Aimiwu, J., Wang, H. *et al.* RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012; 119(22), 5229-5238.
- Akiyama Y, Watkins N *et al.* GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol. Cell Biol.* 2003;23(23), 8429-8439.
- Alberts B JA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5th edition.
- Alves G, Tatro A, Fanning T. Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. *Gene*. 1996; 176(1-2):39-44.
- An J, Kim K, Rhee SM, Chae H, Nephew KP, Kim S. Genome-wide analysis and modeling of DNA methylation susceptibility in 30 breast cancer cell lines by using CpG flanking sequences. *J Bioinform Comput Biol*. 2013; 11(3):1341003.
- Andreu-Vieyra CV, Berenson JR. The potential of panobinostat as a treatment option in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Ther Adv Hematol*. 2014; 5(6), 197-210.
- Aran D, Toperoff G *et al.* Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20(4), 670-680.
- Aravin AA, Sachidanandam R *et al.* A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* 2008; 31(6), 785-799.
- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11, 384-400.

- Asgatay S, Champion C *et al.* Synthesis and evaluation of analogues of N-phthaloyl-l-tryptophan (RG108) as inhibitors of DNA methyltransferase 1. *J. Med. Chem.* 2014; 57(2), 421-434.
- Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* 2012; 94 (11):2202-11.
- Aufsatz W, Mette MF *et al.* RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99(Suppl 4), 16499-16506.
- Azad N, Zahnow CA, Rudin CM, Baylin SB. The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013; 10(5), 256-66.
- Bacolla A, Pradhan S *et al.* Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(46), 33011-33019.
- Bannister A, and Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research.* 2011; 21 (3), 381-95.
- Barbieri I, Cannizzaro E, Dawson MA. Bromodomains as therapeutic targets in cancer. *BriefFunct Genomics.* 2013; 12, 219-230.
- Barret JM, Kruczynski A, Etiévant C, Hill BT. Synergistic effects of F 11782, a novel dual inhibitor of topoisomerases I and II, in combination with other anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002; 49(6), 479-86.
- Bargaje R, Alam MP, Patowary A *et al.* Proximity of H2A.Z containing nucleosome to the transcription start site influences gene expression levels in the mammalian liver and brain. *Nucleic Acids Research* 2012; 40(18): 8965–78.
- Baud MG, Leiser T *et al.* Defining the mechanism of action and enzymatic selectivity of psammaplin A against its epigenetic targets. *J Med Chem.* 2012;55(4), 1731-50
- Baud MG, Leiser T *et al.* Thioester derivatives of the natural product psammaplin A as potent histone deacetylase inhibitors. *Beilstein. J. Org. Chem.* 2013; (9), 81-88.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(2), 107-16.
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(10),726-34. Review.
- Beiter T, Reich E, Williams RW, Simon P. Antisense transcription: a critical look in both directions. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(1), 94-112.

- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*. 2004; 304(5675):1321-5.
- Bergstein, I. A non-Darwinian role for mutagenesis in stem cell-derived cancers. *Mol. Carcinog*. 2003; 36(1), 1-5.
- Best AM, Chang J, Dull AB, Beutler JA, Martinez ED. Identification of four potential epigenetic modulators from the NCI structural diversity library using a cell-based assay. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011, 868095.
- Bestor TH and Ingram VM. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983; 80(18), 5559-5563.
- Bestor TH. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*. 1988; 74 (1), 9-12.
- Bestor TH, Laudano A. *et al.* Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 1988; 203(4), 971-983.
- Bestor TH and Verdine GL. DNA methyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6(3), 380-389.
- Bestor TH. Transposons reanimated in mice. *Cell*. 2005; 122(3):322-5. Review.
- Bhatla T, Wang J *et al.* Epigenetic reprogramming reverses the relapse-specific gene expression signature and restores chemosensitivity in childhood B-lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 119(22), 5201-5210.
- Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*. 2010; 463(7284), 1042-1047.
- Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011; 146(6), 866-72.
- Bianchi C and Zangi R. UHRF1 discriminates against binding to fully-methylated CpG-Sites by steric repulsion. *Biophys. Chem.* 2013; 171, 38-45.
- Bibikova M, Barnes B *et al.* High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011; 98(4), 288-295.
- Bihl MP, Foerster A, Lugli A, Zlobec I. Characterization of CDKN2A(p16) methylation and impact in colorectal cancer: systematic analysis using pyrosequencing. *J Transl Med*. 2012; 10, 173.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16(1):6-21. Review.

Biswal, B. K., Beyrouthy, M. J. *et al.* Acute hypersensitivity of pluripotent testicular cancer-derived embryonal carcinoma to low-dose 5-aza deoxycytidine is associated with global DNA Damage-associated p53 activation, anti-pluripotency and DNA demethylation. *PLoS. One.* 2012; 7(12), e53003.

Bitterge B, Schneider R. Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res.* 2014; 356(3):457-66. Review.

Bodiford A, Bodge M, Talbott MS, Reddy NM. Profile of belinostat for the treatment of relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Onco Targets Ther.* 2014; 7, 1971-1977.

Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma.* 2009; 118(5):549-65. Review.

Borchardt RT. S-Adenosyl-L-methionine-dependent macromolecule methyltransferases: potential targets for the design of chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.* 1980; 23(4), 347-357.

Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M *et al.* Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol.* 2001; 159(2), 661-669.

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science.* 2001; 294(5551), 2536-2539.

Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature.* 2004; 431(7004), 96-99.

Branco MR, Pombo A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.* 2006; (5):e138.

Brena RM, Auer H *et al.* Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(3), e17.

Britten RJ, Kohne DE. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science.* 1968; 161(3841):529-40.

Brown RGS, Kawaide H, Yang YY, Rademacher W, Kamiya Y. Daminozide and prohexadione have similar modes of action as inhibitors of the late stages of gibberellin metabolism. *Physiol. Plant.* 1997; 101, 309-313.

- Brueckner B, Garcia BR *et al.* Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res.* 2005; 65(14), 6305-6311.
- Brueckner B, Kuck D, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J.* 2007; 13(1), 17-22.
- Butler JS, Koutelou E *et al.* Histone-modifying enzymes: regulators of developmental decisions and drivers of human disease. *Epigenomics.* 2012; 4(2), 163-177.
- Byun HM, Choi SH, Laird PW, Trinh B, Siddiqui MA, Marquez VE, Yang AS. 2'-Deoxy-N4-[2-(4-nitrophenyl)ethoxycarbonyl]-5-azacytidine: a novel inhibitor of DNA methyltransferase that requires activation by human carboxylesterase 1. *Cancer Lett.* 2008; 266(2), 238-48.
- Cahill DP, Kinzler KW *et al.* Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999; 9(12), M57-M60.
- Caley DP, Pink RC *et al.* Long noncoding RNAs, chromatin, and development. *Scientific World Journal.* 2010; (10), 90-102.
- Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* 1999; (1), 103-7.
- Campan M, Weisenberger DJ, Trinh B, Laird PW. MethyLight. *Methods Mol Biol.* 2009; 507, 325-37.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N *et al.* (RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science.* 2005; 309(5740), 1559-63.
- Ceccaldi A, Rajavelu A *et al.* C5-DNA methyltransferase inhibitors: from screening to effects on zebrafish embryo development. *Chembiochem.* 2011; 12(9), 1337-1345.
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009; (5), 295-304. Review.
- Chai J, Charboneau AL *et al.* Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates p21CIP/WAF1 and p16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells. *Cancer Res.* 2005; 65(22), 10192-10198.
- Chan KK, Giannini DD, Staroscik JA, Sadee W. 5-Azacytidine hydrolysis kinetics measured by high-pressure liquid chromatography and ¹³C-NMR spectroscopy. *J Pharm Sci.* 1979; 68(7), 807-12.

- Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in preleukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2013; 98, 648-657.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick R. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*. 2007; 318 (5849), 444-7.
- Chen T, Hevi S *et al.* Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat. Genet.* 2007; 39(3), 391-396.
- Chen L, Zhang HY. Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Molecules*. 2007; (12), 946-957.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(5), 399-409.
- Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2004 ; 24(3), 1270-8.
- Cheng X and Blumenthal RM. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*. 2010; 49(14), 2999-3008.
- Chiappinelli KB, Strissel PL *et al.* Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015; 162(5), 974-86.
- Chik F and Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis* 2011; 32(2), 224-232.
- Choudhuri S. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol Mech Methods*. 2011; (4):252-74.
- Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002; 21(35), 5483-95.
- Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW, Liang G, Yang AS, Jones PA. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Molecular cancer therapeutics*. 2005; 4, 1515-1520.
- Clark SJ, Harrison J *et al.* High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(15), 2990-2997.

- Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci.* 2008; (10):1509-22. Review.
- Clozel T, Yang S, Elstrom RL *et al.* Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Discov.* 2013; 3(9), 1002-19.
- Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, Statham AL, Kassir Z, Moreno CS, Young AN, Varma V, Speed TP, Cowley M, Lacaze P, Kaplan W, Robinson MD, Clark SJ. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(3):235-46.
- Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Research.* 1999; 59, 3352-3356.
- Cornacchia E, Golbus J *et al.* Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J. Immunol.* 1988; 140(7), 2197-2200.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* 2000; (24), 132-8.
- Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(3). Review
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol.* 1999; 145(6):1119-31.
- Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Basavapathruni A, Jin L, Boriack-Sjodin PA, *et al.* Potent inhibition of DOT1L as a treatment for MLL-fusion leukemia. *Blood.* 2013 ; 122, 1017-1025.
- Dante R, Dante-Paire J, Rigal D, Roizès G. Methylation patterns of long interspersed repeated DNA and alphoid repetitive DNA from human cell lines and tumors. *Anticancer Res.* 1992; 12(2):559-63.
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Köhler G, Wijermans P, Jones PA, Lübbert M. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood.* 2002; 100(8), 2957-64.

Datta J, Ghoshal K *et al.* A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res.* 2009; 69(10), 4277-4285.

Davuluri RV, Grosse I, Zhang MQ. Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat Genet.* 2001; 29(4):412-7.

Deplus R, Brenner C *et al.* Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(17), 3831-3838.

De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol.* 1999; (11):7327-35.

Di Lorenzo A, Bedford MT. Histone arginine methylation. *FEBS Lett.* 2011; 585, 2024-2031.

Djupedal I, Ekwall K. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. *Cell Res.* 2009; (3):282-95. Review.

Doi, A., Park, I. H. *et al.* Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 2009; 41 (12), 1350 - 1353.

Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16(9),519-32.

Eden A, Gaudet F *et al.* Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* 2003; 300(5618), 455.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002; 21(35):5400-13.

ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012; 489(7414):57-74.

Erdmann A, Menon Y, Gros C, Molinier N, Novosad N, Samson A, Gregoire JM, Long C, Ausseil F, Halby L, Arimondo PB. Design and synthesis of new non nucleoside inhibitors of DNMT3A. *Bioorg Med Chem.* 2015a; 23(17), 5946-53.

Erdmann A, Menon Y, Gros C, Masson V, Aussagues Y, Ausseil F, Novosad N, Schambel P, Baltas M and Arimondo PB. Identification and optimization of hydrazone-gallate derivatives as specific inhibitors of DNA methyltransferase 3A. *Future Medicinal Chemistry.* 2015b; submitted for publication.

- Erdmann A, Halby L, Fahy J, Arimondo PB. Targeting DNA methylation with small molecules: what's next? *J Med Chem.* 2015c; 58(6), 2569-83.
- Espada J, Esteller M. Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(4):449-57. Review.
- Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; (2):238-46. Review.
- Espinoza CA, Allen TA *et al.* B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11(9), 822-829.
- Estécio MR, Gallegos J, Vallot C, Castoro RJ, Chung W, Maegawa S, Oki Y, Kondo Y, Jelinek J, Shen L, Hartung H, Aplan PD, Czerniak BA, Liang S, Issa JP. Genome architecture marked by retrotransposons modulates predisposition to DNA methylation in cancer. *Genome Res.* 2010; 20(10):1369-82.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(7):564-9.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001; (61), 3225-9.
- Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clinical Immunology.* 2003; 109, 80-88. Review.
- Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007; 15(16) Spec No 1:R50-9. Review.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358(11), 1148-1159.
- Esteller M. Cancer, epigenetics and the Nobel Prizes. *Mol. Oncol.* 2012; 6(6), 565-566.
- Fabbri M, Garzon R *et al.* MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104(40), 15805-15810.
- Fagan RL, Cryderman DE, Kopelovich L, Wallrath LL, Brenner C. Laccaic Acid A Is a Direct, DNA-competitive Inhibitor of DNA Methyltransferase 1. *J Biol Chem.* 2013; (288), 23858-23867.
- Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(9):637-43.

- Fandy TE, Herman JG *et al.* Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2009; 114(13), 2764-73.
- Fang MZ, Chen D *et al.* Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARBeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11(19 Pt 1), 7033-7041.
- Fatemi M, Hermann A *et al.* Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur. J. Biochem*. 2002; 269(20), 4981-4984.
- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983; 301, 89-92.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(2), 143-53.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(1), 21-33.
- Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007; 447(7143), 433-440.
- Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003 ; 421(6921):448-53. Review.
- Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM. Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(21):12253-8.
- Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM. DNA motifs associated with aberrant CpG island methylation. *Genomics*. 2006; 87(5):572-9.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 2011; 473, 398-402.
- Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010; 468(7327), 1067-73.
- Florl AR, Löwer R, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 1999; 80(9):1312-21.
- Flotho C, Claus R *et al.* The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2009; 23(6), 1019-1028.

- Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques*. 2002; 33(3), 632, 634, 636-49.
- Fraga MF, Ballestar E *et al*. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 2005; 37(4), 391-400.
- Franchini DM, Schmitz KM, Petersen-Mahrt SK. 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. *Annu Rev Genet.* 2012; 46, 419-41.
- Frick L, Yang C, Marquez VE, Wolfenden R. Binding of pyrimidin-2-one ribonucleoside by cytidine deaminase as the transition-state analogue 3,4-dihydrouridine and the contribution of the 4-hydroxyl group to its binding affinity. *Biochemistry*. 1989; (28), 9423-9430.
- Friedman JM, Liang G *et al*. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res.* 2009; 69(6), 2623-2629.
- Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet.* 2006; 38(5):540-9.
- Fryxell KJ, Moon WJ. CpG mutation rates in the human genome are highly dependent on local GC content. *Mol Biol Evol.* 2005 ; (3):650-8.
- Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene*. 2011; 30(31),3391-403. Review.
- Funakoshi, R., M. Irie, T. Ukita.. Synthesis of unnatural pyrimidine nucleosides. *Chem. Pharm. Bull.* 1961; 9, 406-409.
- Gaddis M, Gerrard D, Frietze S, Farnham PJ. Altering cancer transcriptomes using epigenomic inhibitors. *Epigenetics Chromatin*. 2015; 8: 9.
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW *et al*. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11, 6883-94.
- Gamage SA, Brooke DG *et al*. Structure-activity relationships for 4-anilinoquinoline derivatives as inhibitors of the DNA methyltransferase enzyme DNMT1. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21(11), 3147-3153.
- Gao J, Wang L *et al*. Aberrant DNA methyltransferase expression in pancreatic ductal adenocarcinoma development and progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2013; 32(1), 86.

García J, Franci G, Pereira R, Benedetti R *et al.* Epigenetic profiling of the antitumor natural product psammaplin A and its analogues. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19(12), 3637-49.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology.* 1987; 196, 261-282.

Gaudet F, Hodgson JG *et al.* Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science.* 2003; 300(5618), 489-492.

Ge YZ, Pu MT *et al.* Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(24), 25447-25454.

Goll MG, Kirpekar F *et al.* Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science.* 2006; 311(5759), 395-398.

Goyal R, Reinhardt R *et al.* Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(4), 1182-1188.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 1995; 55(22):5195-9.

Gravina GL, Festuccia C *et al.* Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Mol. Cancer.* 2010; 9,305.

Griffiths EA and Gore SD. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin. Hematol.* 2008; 45(1), 23-30.

Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispé S, Arimondo PB. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie.* 2012; 94(11):2280-96.

Gros C, Chauvigné L, Poulet A, Menon Y, Ausseil F, Dufau I, Arimondo PB. Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(19), e185.

Gu S and Kay MA. How do miRNAs mediate translational repression? *Silence.* 2010; 1(1), 11.

Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, van Steensel B. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature.* 2008; 453(7197):948-51.

- Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, El Solh H, Bhatia K. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*. 2003; 17, 1845-1850.
- Halby L, Champion C, Sénamaud-Beaufort C, Ajjan S, Drujon T, Rajavelu A, Ceccaldi A, Jurkowska R, Lequin O, Nelson WG, Guy A, Jeltsch A, Guianvarc'h D, Ferroud C, Arimondo PB. Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide. *Chembiochem*. 2012; 13(1), 157-65.
- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 2004; 1; 59(2),177-89.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1), 57-70.
- Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5), 646-674.
- Hanahan D and Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21(3), 309-322.
- Hansen RS, Wijmenga C *et al*. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999; 96(25), 14412-14417.
- Hatzimichael E and Crook T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges. *J. Drug Deliv*. 2013; 2013, 529312.
- He L and Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*. 2004; 5(7), 522-531.
- He XJ, Chen T, Zhu JK. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res*. 2011; (3):442-65.
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J*. 1988; (5), 1395-402.
- Henderson IR, Jacobsen SE. Epigenetic inheritance in plants. *Nature*. 2007; 447(7143), 418-24. Review.
- Hellman A and Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. 2007; 315 (5815), 1141-1143.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(21):9700-4.

- Herman JG, Graff JR *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996a; 93(18), 9821-9826.
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Research.* 1996b; 56, 722-727.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(12):6870-5.
- Hermann A, Gowher H *et al.* Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(19-20), 2571-2587.
- Hernando E. microRNAs and cancer: role in tumorigenesis, patient classification and therapy. *Clin Transl Oncol.* 2007; 9(3), 155-60.
- Hlady RA, Novakova S *et al.* Loss of Dnmt3b function upregulates the tumor modifier Mnt and accelerates mouse lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(1), 163-177.
- Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR, Zamir A. Structure of a ribonucleic acid. *Science.* 1965a; 147(3664), 1462-5.
- Holley RW, Everett GA, Madison JT, Zamir A. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem.* 1965b; 240, 2122-8.
- Holz-Schietinger C and Reich NO. RNA modulation of the human DNA methyltransferase 3A. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(17), 8550-8557.
- Hongay CF, Grisafi PL *et al.* Antisense transcription controls cell fate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 2006; 127(4), 735-745.
- Hossain MZ, Healey MA, Lee C, Poh W, Yerram SR, Patel K, Azad NS, Herman JG, Kern SE. DNA-intercalators causing rapid re-expression of methylated and silenced genes in cancer cells. *Oncotarget.* 2013; (2), 298-309.
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene.* 2008; 27(3):404-8.
- Huang S. Tumor progression: chance and necessity in Darwinian and Lamarckian somatic (mutationless) evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2012; 110(1), 69-86.
- Huang XA, Yin H *et al.* A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs" *Dev. Cell.* 2013; 24(5), 502-516.

Iguchi-Ariga SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 1989; (5):612-9.

Iida T, Suetake I *et al.* PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells.* 2002; 7(10), 997-1007.

Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J *et al.* A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biology.* 2008; 6 (1), e22.

Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 2009; 583(11):1713-20.

Illingworth R, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr A, James K, Turner D *et al.* Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS genetics.* 2010; 6 (9).

Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C. *et al.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* 2009; 41(2), 178-186.

Issa JJ, Roboz G, Rizzieri D *et al.* Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2015; S1470-2045(15)00038-8.

Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61(21):7959-63.

Jeltsch A, Friedrich T *et al.* Kinetics of methylation and binding of DNA by the EcoRV adenine-N6 methyltransferase. *J. Mol. Biol.* 1998; 275(5), 747-758.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001; 293, 1074-1080.

Jia D, Jurkowska RZ *et al.* Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature.* 2007; 449 7159), 248-251.

Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet.* 2009; (3):161-72. Review.

Jjingo D, Conley AB *et al.* On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget.* 2012; 3(4), 462-474.

Jeltsch A. On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics.* 2006; 1(2), 63-66.

- Johnson RL, Huang W. *et al.* A quantitative high-throughput screen identifies potential epigenetic modulators of gene expression. *Anal. Biochem.* 2008; 375(2), 237-248.
- Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980; 20, 85-93.
- Jones PA and Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; 128, 683-692.
- Ju, J, Lu G, Lambert JD, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin Cancer Biol.* 2007; (17), 395-402.
- Juergens RA, Wrangle J *et al.* Combination Epigenetic Therapy Has Efficacy in Patients with Refractory Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discovery.* 2011; 1(7), 598-607.
- Jurkowska RZ, Anspach N *et al.* Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(21), 6656-6663.
- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 2011; 12 (2), 206-22.
- Jurkowski TP, Meusburger M *et al.* Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA.* 2008; 14(8), 1663-1670.
- Kalac M, Scotto L, Marchi E, Amengual J *et al.* HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL. *Blood.* 2011; 118(20), 5506-16.
- Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R; FDA. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(10), 3604-8.
- Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, de Castro C, Ravandi F, Helmer R 3rd, Shen L, Nimer SD, Leavitt R, Raza A, Saba H. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 2006; 106(8), 1794-803.
- Kassis ES, Zhao M *et al.* Depletion of DNA methyltransferase 1 and/or DNA methyltransferase 3b mediates growth arrest and apoptosis in lung and esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2006; 131(2), 298-306.
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M *et al.* (RIKEN Genome Exploration Research Group; Genome Science Group; FANTOM Consortium). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science.* 2005; 309(5740), 1564-6.

- Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 11(12), 1695-713. Review.
- Kelly TK, Liu Y, Lay FD, Liang G, Berman BP, Jones PA. Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules. *Genome Res*. 2012; 22(12), 2497-506.
- Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, Pikarski E, Young RA, Niveleau A, Cedar H, Simon I. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet*. 2006; 38(2):149-53.
- Khalil AM, Guttman M *et al*. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2009; 106(28), 11667-11672.
- Kilgore JA, Du X *et al*. Identification of DNMT1 selective antagonists using a novel scintillation proximity assay. *J. Biol. Chem*. 2013; 288(27), 19673-19684.
- Kim D, Lee IS *et al*. Psammaplin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer Res*. 1999; 19(5B), 4085-4090.
- Kim GD, Ni J *et al*. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J*. 2002; 21(15), 4183-4195.
- Klaus CR, Iwanowicz D, Johnston LD, Campbell CA, Smith JJ, Moyer MP, Copeland RA *et al*. DOT1L Inhibitor EPZ-5676 Displays Synergistic Antiproliferative Activity in Combination with Standard of Care Drugs and Hypomethylating Agents in MLL-Rearranged Leukemia Cells. *J Pharmacol Exp*. 2014; 350(3):646-56.
- Klose RJ and Bird AP. "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators" *Trends Biochem. Sci*. 2006; 31(2), 89-97.
- Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang KC, Xiao Y, *et al*. Selective Inhibition of EZH2 by EPZ-6438 Leads to Potent Antitumor Activity in EZH2 Mutant Non-Hodgkin Lymphoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014; 13(4), 842-854
- Kornberg A, Bertsch LL, Jackson JF, Khorana HG. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, XVI. Oligonucleotides as templates and the mechanism of their replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964; 51, 315-323.
- Krämer OH, Göttlicher M, Heinzl T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12(7), 294-300. Review.
- Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 2009;324 (5929), 929-30.

- Kruger RG, Mohammad H, Smitheman K, Cusan M, Liu Y, Pappalardi M, Federowicz K, Van Aller G, Kasparec J, Tian X, et al. Inhibition of LSD1 as a therapeutic strategy for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 122, 3964.
- Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature*. 2012; 488, 404–408.
- Ku JL, Jeon YK, Park JG. Methylation-specific PCR. *Methods Mol. Biol.* 2011; 791, 23-32.
- Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2008; 22, 1529-1538.
- Kuang Y, El-Khoueiry A, Taverna P, Ljungman M, Neamati N. Guadecitabine (SGI-110) priming sensitizes hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin. *Mol Oncol*. 2015; S1574-7891(15)00126-X.
- Kuck D, Caulfield T, Lyko, F, Medina-Franco JL. Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2010; (9), 3015-3023.
- Kunert N, Marhold J *et al.* A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development*. 2003; 130(21), 5083-5090.
- Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD. Histoneacetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev*. 1998; 12, 627-639.
- Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T *et al.* DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev*. 2008; 22(7), 908-917.
- Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol*. 1996; 135(5):1195-205.
- Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev. Genet*. 2010; 11(3), 191-203.
- Lan J, Hua S *et al.* DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 2010; 42(4), 243-252.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822):860-921.

- Lauster R, Trautner T A *et al.* Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J. Mol. Biol.* 1989; 206 (2), 305-312.
- Lay FD, Liu Y, Kelly TK *et al.* The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome. *Genome Research.* 2015.
- Lee MG, Wynder C, Schmidt DM, Mc Cafferty DG, Shiekhattar R. Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of non selective anti depressive medications. *Chem. Biol.* 2006; 13, 563-567.
- Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(24):11733-7.
- Lee WJ, Shim JY, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol.* 2005; 68(4), 1018-30.
- Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis.* 2006; (27), 269-277.
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 2003; 13(14):1192-200.
- Lengauer C, Kinzler KW *et al.* Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396 (6712), 643-649.
- Ley TJ, Ding L *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(25), 2424-2433.
- Li E, Bestor TH *et al.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992; 69(6), 915-926.
- Li H, Chiappinelli KB, Guzzetta AA, Easwaran H *et al.* Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget.* 2014; 5(3), 587-598.
- Lin JC, Jeong S *et al.* Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell.* 2007; 12(5), 43 -444.
- Lin YS, Shaw AY *et al.* Identification of novel DNA methylation inhibitors via a two-component reporter gene system. *J. Biomed. Sci.* 2011; 18, 3-10.

- Lin Y, Fan H *et al.* Detecting S-adenosyl-L-methionine-induced conformational change of a histone methyltransferase using a homogeneous time-resolved fluorescence-based binding assay. *Anal. Biochem.* 2012; 423(1), 171-177.
- Link A, Balaguer F, Shen Y, Lozano JJ, Leung HC, Boland CR, Goel A. Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2013; 8(2), e57709.
- Licciardi PV, Kwa FA *et al.* Influence of natural and synthetic histone deacetylase inhibitors on chromatin. *Antioxid. Redox. Signal.* 2012; 17(2), 340-354.
- Liu Z, Xie Z *et al.* Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009; 19(3), 706-709.
- Liu X, Gao Q *et al.* UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat Commun.* 2013; 4; 1563.
- Liu YN, Zhang N, Wu Y, Yang L, Ding XY, Zhou JF, Xiao M. DNMT3A mutation analysis in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015; 35(3),337-42.
- Long C, Yin B *et al.* Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest.* 2007; 25(8), 685-690.
- Ludgate JL, Le MG *et al.* Global demethylation in loss of imprinting subtype of Wilms tumor. *Genes Chromosomes. Cancer.* 2013; 52(2), 174-184.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997; 389(6648):251-60.
- Maes T, Tirapu I, Mascaro C, Ortega A, Estiarte A, Nuria V, Castro-Palomino J, Buesa Arjol C, Kurz G, and Genomics O. Preclinical characterization of a potent and selective inhibitor of the histone demethylase KDM1A for MLL leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31, e13543.
- Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2015; 23, 52-60.
- Marchi E, Zullo KM, Amengual JE, Kalac M, Kalac M *et al.* The combination of hypomethylating agents and histone deacetylase inhibitors produce marked synergy in preclinical models of T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2015; Epub ahead of print.
- Margot JB, Ehrenhofer-Murray AE *et al.* Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC. Mol. Biol.* 2003; 4:7.
- Mariner PD, Walters RD *et al.* Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol. Cell.* 2008; 29(4), 499-509.

- Mariño-Ramírez L, Spouge JL, Kanga GC, Landsman D. Statistical analysis of over-represented words in human promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(3):949-58.
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(15), 1210-6. Review.
- Martens JA, Laprade L *et al.* Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature.* 2004; 429(6991), 571-574.
- Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6, 838-849.
- Matei D, Fang F *et al.* Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2012; 72(9), 2197-2205.
- Matthaei JH, Jones OW, Martin RG, Nirenberg MW. Characteristics and composition of RNA coding units. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962; 48, 666-677.
- Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 2006; 15, Spec No 1:R17-29. Review.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D. *et al.* "Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs" *Cell.* 1989; 58 (3), 499-507.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D. *et al.* "Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA" *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(19), 5085-5092.
- Meissner A, Mikkelsen TS *et al.* Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells" *Nature.* 2008; 454(7205), 766-770.
- Melki JR, Vincent PC, Brown RD, Clark SJ. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood.* 2000 ; 95, 3208-3213.
- Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett.* 2011; 585(13), 2087-99. Review.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995; (7):686-92.
- Meselson M, Stahl FW. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1958; 44(7), 671-682.
- Mette MF, Aufsatz W *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 2000; 19(19), 5194-5201.

- Metzeler KH, Walker A *et al.* DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012; 26(5), 1106-1107.
- Mikeska T, Candiloro IL, Dobrovic A. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation. *Epigenomics*. 2010; 2(4),561-573.
- Miranda, T. B., Cortez, C. C. *et al.* DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8(6), 1579-1588.
- Mizuno S, Chijiwa T *et al.* Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001; 97(5), 1172-1179.
- Momparler RL. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Pharmacology & therapeutics*. 1985a; 30, 287-299.
- Momparler RL, Bouchard J, Samson J. Induction of differentiation and inhibition of DNA methylation in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-AZA-2'- deoxycytidine. *Leukemia Research*. 1985b; 9, 1361-1366.
- Momparler RL, Rivard GE, Gyger M. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacology & therapeutics*. 1985c; 30, 277-286.
- Momparler RL. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* 2005; 42(3 Suppl 2), S9 - 16.
- Morgan T. Sex limited inheritance in Drosophila. *Science*. 1910; 32(812):120-2.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998; 393(6683):386-9.
- Nandakumar V, Vaid M, Katiyar SK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011; (32), 537-544.
- Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21(3), 470-9.
- Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc*. 2006; 1(1), 179-85.
- Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S *et al.* Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*. 2010; 468(7327), 1119-23.

- Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Yanagihara K, Sakamoto H, Yoshida T, Sasaki H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.* 2005; 65(6):2115-24.
- Notari RE, DeYoung JL. Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *J Pharm Sci.* 1975; 64(7), 1148-1157.
- Nowak S, and Corces V. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in genetics.* 2004; 20(4), 214-20.
- Nowel P, Hungerford D. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960; 132, 1497.
- Ogawa O, Eccles M R *et al.* Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature.* 1993; 362 (6422), 749-751.
- Ohno S. So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol.* 1972; 23:366-70.
- Okano M, Xie S *et al.* Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 1998a; 19(3), 219-220.
- Okano M, Xie S *et al.* Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 1998b; 26(11), 2536-2540.
- Oki, Y., Jelinek, J. *et al.* Induction of hypomethylation and molecular response after decitabine therapy in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2008; 111(4), 2382-2384.
- Onetto N, Momparler RL, Momparler LF, Gyger M. *In vitro* biochemical tests to evaluate the response to therapy of acute leukemia with cytosine arabinoside or 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Seminars in oncology.* 1987; 14, 237-237.
- Ooi SK, Qiu C *et al.* DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature.* 2007; 448(7154), 714-717.
- Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, Grønbæk K. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget.* 2015; 6(11), 9612-26.
- Palazzo AF, Gregory TR. The case for junk DNA. *PLoS Genet.* 2014; 10(5).
- Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol.* 2004; 5(7), R44.
- Pardo C, Carr IM, Hoffman C, Darst R, Markham AF, Bonthron DT, Kladde M. MethylViewer: computational analysis and editing for bisulphite sequencing and

Methyltransferase Accessibility Protocol for Individual Templates (MAPit) projects. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan 1; 39(1), e5.

Paroush Z, Keshet I, Yisraeli J. Cedar, H., Dynamics of demethylation and activation of the alpha-actin gene in myoblasts. *Cell.* 1990; 63(6), 1229-37.

Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003; 63(5):1114-21.

Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, Prabhakar S, Nobrega MA, Shoukry M, Minovitsky S, Dubchak I, Holt A, Lewis KD, Plajzer-Frick I, Akiyama J, De Val S, Afzal V, Black BL, Couronne O, Eisen MB, Visel A, Rubin EM. In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature.* 2006; 444(7118):499-502.

Pereira R, Benedetti R *et al.* Indole-derived psammaplin A analogues as epigenetic modulators with multiple inhibitory activities. *J Med Chem.* 2012; 55(22), 9467-91.

Pesnel S, Pillon A, Créancier L, Guilbaud N, Bailly C, Kruczynski A, Lerondel S, Le Pape A. Quantitation in bioluminescence imaging by correction of tissue absorption for experimental oncology. *Mol Imaging Biol.* 2011; 13(4), 646-52.

Pesnel S, Pillon A, Créancier L, Lerondel S, Le Pape A, Recher C, Demur C, Guilbaud N, Kruczynski A. Optical imaging of disseminated leukemia models in mice with near-infrared probe conjugated to a monoclonal antibody. *PLoS One.* 2012;7(1), e30690.

Petruk S, Sedkov Y *et al.* Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. *Cell.* 2006; 127(6), 1209-1221.

Pina IC, Gautschi JT *et al.* Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J. Org. Chem.* 2003; 68(10), 3866-3873.

Pliml J, Sorm F. Synthesis of a 2'-deoxy-D-ribofuranosyl 5-azacytosine. *Collection of Czechoslovak chemical communications.* 1964 ; 29, 2576.

Popovic R, Licht JD. Emerging epigenetic targets and therapies in cancer medicine. *Cancer Discov.* 2012; 2(5),405-13. Review.

Pradhan S, Talbot D *et al.* Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(22), 4666-4673.

Pradhan S, Bacolla A *et al.* Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(46), 33002-33010.

- Pradhan S and Esteve PO. Allosteric activator domain of maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and its role in methylation spreading. *Biochemistry*. 2003; 42(18), 5321-5332.
- Prendergast GC, Ziff EB. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*. 1991; 251(4990):186-9.
- Prokhortchouk E and Defossez PA. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1783(11), 2167-2173.
- Qin W, Zhang K, Clarke K, Weiland T, Sauter ER. Methylation and miRNA effects of resveratrol on mammary tumors vs. normal tissue. *Nutr Cancer*. 2014; (66), 270-277.
- Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science*. 1980; 210, 604-610. Review .
- Reddington, J. P., Pennings, S. *et al.* "Non-canonical functions of the DNA methylome in gene regulation" *Biochem. J*. 2013; 451(1), 13-23.
- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*. 1982; 300, 149-52.
- Richel DJ, Colly LP, Kluin-Nelemans JC, Willemze R. The antileukaemic activity of 5-Aza-2 deoxycytidine (Aza-dC) in patients with relapsed and resistant leukaemia. *British journal of cancer*. 1991; 64, 144-148.
- Riggs AD, Xiong Z *et al.* Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. *Novartis. Found. Symp*. 1998; 214, 214 - 225.
- Rilova E, Erdmann A, Gros C, Masson V, Aussagues Y, Poughon-Cassabois V, Rajavelu A, Jeltsch A, Menon Y *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 4-amino-N- (4-aminophenyl)benzamide analogues of quinoline-based SGI-1027 as inhibitors of DNA methylation. *ChemMedChem*. 2014; 9(3), 590-601.
- Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, Momparler LF. Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leukemia Research*. 1981;5, 453-462.
- Robertson KD, Uzvolgyi E *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(11), 2291-2298.
- Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20 (24), 3139-3155.

- Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 ; 103(17):6506-11.
- Rohde C, Zhang Y, Reinhardt R, Jeltsch A. BISMA--fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. *BMC Bioinformatics*. 2010; (6)11, 230.
- Roidl D, Hacker C. Histone methylation during neural development. *Cell Tissue Res*. 2014; 356(3):539-52.
- Roulois D, Loo Yau H *et al*. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015; 162(5), 961-73.
- Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973; 243, 290-3.
- Rudek M.A. *et al*. Pharmacokinetics of 5-azacitidine administered with phenylbutyrate in patients with refractory solid tumors or hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol*. 2005; 23, 3906-3911.
- Sako F, Kobayashi N *et al*. A study on the toxicity of natural food dyes--toxicity and enzyme inhibition in *Paramecium caudatum*. *J. Toxicol. Sci*. 1978; 3(2), 127-136.
- Sandoval J. *et al*. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011; (6), 692-702.
- Santi DV, Norment A *et al*. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984; 81(22), 6993-6997.
- Santoro R and Grummt I. Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol. Cell*. 2001; 8(3), 719-725.
- Sasai N, Defossez PA. Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol*. 2009;53(2-3):323-34. Review.
- Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet*. 2010; 70, 57-85.
- Scarano E, Iaccarino M, Grippo P, Parisi E. The heterogeneity of thymine methyl group origin in DNA pyrimidine isostichs of developing sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 57 (5): 1394-1400.
- Schaefer M and Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*. 2010; 119(1), 35-40.

- Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, Zolghadr K, Margot JB, Cardoso MC, Leonhardt H. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods*. 2005; 2(10),751-6.
- Schlesinger Y, Straussman R *et al*. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat. Genet*. 2007; 39(2), 232-236.
- Schluckebier G, Kozak M *et al*. Differential binding of S-adenosylmethionine S-adenosylhomocysteine and Sinefungin to the adenine-specific DNA methyltransferase M.TaqI. *J. Mol. Biol*. 1997; 265(1), 56-67.
- Schmidt DM, Mc Cafferty DG. Trans-2-Phenylcyclopropylamine is a mechanismbased inactivator of the histone demethylase LSD1. *Biochemistry*. 2007; 46, 4408–4416.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol*. 2004; 6, 73-77.
- Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*. 2008; 132(5):887-98.
- Schorderet DF, Gartler SM. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(3):957-61.
- Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Pishchik V, Figg WD, Murgo AJ, Steinberg SM. Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(19), 5777-85.
- Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarten N, Cheng J, Gingeras T, Petronis A. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(2), 528-542.
- Schwartz BE, Hofer MD, Lemieux ME, Bauer DE, Cameron MJ, West NH *et al*. Differentiation of NUT midline carcinoma by epigenomic reprogramming. *Cancer Res*. 2011; 71(7), 2686-96.
- Seidel C, Florean C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. *Biochimie*. 2012; 94(11), 2264-79. Review.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31, 27-36.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine J, Cole P, *et al*. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004; 119(7), 941-53.

Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8, 829-833.

Shih AH, Abdel-Wahab O *et al.* The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev. Cancer.* 2012; 12(9), 599-612.

Shima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. *Int J Cancer.* 2011 ; 128, 1080-1094.

Shin, J., Lee, H. S. *et al.* (2000). "New Bromotyrosine Metabolites from the Sponge *Aplysina rhax*" *Tetrahedron* **56** (46), 9071 - 9077.

Shivaswamy S, Bhinge A *et al.* Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS. Biol.* 2008; 6(3), e65.

Si J, Boumber YA, Shu J, Qin T, Ahmed S, He R, Jelinek J, Issa JP. Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation. *Cancer Res.* 2010; 70(17), 6968-77.

Simmen MW. Genome-scale relationships between cytosine methylation and dinucleotide abundances in animals. *Genomics* . 2008; 92 (1), 33 – 40.

Singh BN, Shankar S *et al.* Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 2011; 82(12), 1807-1821.

Singh V, Sharma P, Capalash N. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2013; 13(4), 379-399.

Smith CL, Peterson CL. A conserved Swi2/Snf2 ATPase motif couples ATP hydrolysis to chromatin remodeling. *Mol Cell Biol.* 2005; (14):5880-92.

Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(3), 204-20.

Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 2005; 113(4), 264-8.

Song J, Rechko O, Bestor TH, Patel DJ. Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation. *Science.* 2011; 331(6020), 1036-1040.

- Song LX, Xu L *et al.* Clinical outcome of treatment with a combined regimen of decitabine and aclacinomycin/cytarabine for patients with refractory acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 2012; 91(12), 1879-1886.
- Song MA, Tiirikainen M *et al.* Elucidating the landscape of aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *PLoS. One.* 2013; 8(2), e55761.
- Sorm F and Vesely J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma.* 1968; 15(4), 339-343.
- Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet.* 2007; (4):263-71. Review.
- Squires JE Patel HR *et al.* Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 2012; (11):5023-33.
- Steinhardt JJ and Gartenhaus RB. Epigenetic approaches for chemosensitization of refractory diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Discov.* 2013; 3(9), 968-970.
- Sterner D, and Berger S. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2000; 64 (2), 435-59.
- Stewart DJ, Issa JP, Kurzrock R, Nunez MI, Jelinek J, Hong D, Oki Y, Guo Z, Gupta S, Wistuba II. Decitabine effect on tumor global DNA methylation and other parameters in a phase I trial in refractory solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(11), 3881-8.
- Stancheva, I., Collins, A. L. *et al.* A mutant form of MeCP2 protein associated with human Rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by notch in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell.* 2003; 12(2), 425-435.
- Struhl K, Segal E. Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; (3):267-73.
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.* 2014; (1)4, 80.
- Suh N and Pezzuto JM. Strawberry fields forever? *Cancer Prev. Res. (Phila).* 2012; 5(1), 30- 33.
- Sun HB, Shen J, Yokota H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J.* 2000; 79(1):184-90.
- Suzuki M, Sunaga N *et al.* RNA Interference-Mediated Knockdown of DNA Methyltransferase 1 Leads to Promoter Demethylation and Gene Re-Expression in Human Lung and Breast Cancer Cells. *Cancer Research.* 2004; 64(9), 3137-3143.

Suzuki, M. M. and Bird, A. "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics" *Nat. Rev. Genet.* 2008; 9(6), 465-476.

Suzuki T, Tanaka R *et al.* Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20(3), 1124-1127.

Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol.* 2012; 6(6), 567-78.

Svedruzic ZM and Reich NO. Mechanism of allosteric regulation of Dnmt1's processivity. *Biochemistry.* 2005; 44(45), 14977-14988.

Svotelis A, Gevry N *et al.* Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochem. Cell Biol.* 2009; 87(1), 179-188.

Taberlay PC, Kelly TK, Liu CC, You JS, De Carvalho DD, Miranda TB, Zhou XJ, Liang G, Jones PA. Polycomb-repressed genes have permissive enhancers that initiate reprogramming. *Cell.* 2011;147(6), 1283-94.

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* 2008; 27(20):2681-90.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009; 324(5929), 930-35.

Tamaru H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev.* 2010; 24(14):1465-78.

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(6):3740-5.

Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell.* 1979; 17(4), 771-9.

Takashima S, Takehashi M *et al.* Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.* 2009; 81(1), 155-164.

Thinnes CC, England KS, Kawamura A, Chowdhury R, Schofield CJ, Hopkinson RJ. Targeting histone lysine demethylases - progress, challenges, and the future. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1839(12), 1416-32.

Traina F, Visconte V *et al.* Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia.* 2014; 28(1), 78-87.

- Tran TA, Wichterman-Kouznetsova J *et al.* Identification of small molecule modulators of gene transcription with anticancer activity. *ACS Chem Biol.* 2014; 9(11), 2603-11.
- Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther.* 2006 ; 5(1), 65-70.
- Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics.* 2012; 4(3), 325-41.
- Tu SM. Cancer: a "stem-cell" disease?". *Cancer Cell Int.* 2013; 13(1), 40.
- Valente S, Liu Y, Schnekenburger M *et al.* Selective non-nucleoside inhibitors of human DNA methyltransferases active in cancer including in cancer stem cells. *J Med Chem.* 2014; 57(3), 701-13.
- Vandermeers F, Kettmann R, Willems L. Implication des modifications épigénétiques dans les cancers : développement de nouvelles approches thérapeutiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008; 12(2), 211-218.
- van Holde KE, Sahasrabudde CG, Shaw BR. A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Res.* 1974; 1(11):1579-86.
- van Steensel B, Dekker J. Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nat Biotechnol.* 2010; (10), 1089-95.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(15):8698-702.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al.* The sequence of the human genome. *Science.* 2001 ; 291(5507):1304-51.
- Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics* 2013; 7, 47-60.
- Villar-Garea A, Fraga MF *et al.* Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63(16), 4984-4989.
- Vrba L, Muñoz-Rodríguez JL, Stampfer MR, Futscher BW. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8(1), e54398.

- Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour*. 1942a; 1 : 18-20.
- Waddington CH. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. 1942b; 150: 563–565.
- Waldmann T and Schneider R. Targeting histone modifications--epigenetics in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2013; 25(2), 184-189.
- Walter MJ, Ding L *et al*. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011; 25(7), 1153-1158.
- Walton EL, Francastel C *et al*. Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics*. 2011; 6(11), 1373-1377.
- Wang Y and Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics*. 2004; 20 (7), 1170 - 1177.
- Ward LD, Kellis M. Evidence of abundant purifying selection in humans for recently acquired regulatory functions. *Science*. 2012; 337(6102), 1675-8.
- Warnecke PM, Stirzaker C *et al*. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(21), 4422-4426.
- Warnecke PM, Stirzaker C *et al*. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*. 2002; 27(2), 101-107.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*. 1994; 76(3), 567-76.
- Waterland RA, Lin JR, Smith CA, Jirtle RL. Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. *Hum Mol Genet*. 2006; 1;15(5):705-16.
- Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 171(4356), 737-738.
- Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988; (9):1136-43.
- Weng JR, Lai IL, Yang HC, Lin CN, Bai LY. Identification of kazinol Q, a natural product from Formosan plants, as an inhibitor of DNA methyltransferase. *Phytother. Res*. 2014; (28), 49-54.
- Whetstine J, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, *et al*. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*. 2006; 125(3), 467-81.

- Whitaker JW, Chen Z, Wang W. Predicting the human epigenome from DNA motifs. *Nat Methods*. 2015 ; 12(3), 265-272.
- Wiench M, John S *et al*. DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. *EMBO J*. 2011; 30(15), 3028-3039.
- Wilkinson CR, Bartlett R *et al*. The fission yeast gene *pmt1+* encodes a DNA methyltransferase homologue. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23(2), 203-210.
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J, Helin K. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*. 2011; 473, 343-348.
- Williams K, Christensen J *et al*. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep*. 2012; 13(1), 28-35.
- Wilson VL, Jones PA, Momparler RL. Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Research*. 1983; 43, 3493-3496.
- Witcher M and Emerson BM. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol. Cell*. 2009; 34(3), 271-284.
- Witzig T.E. Induction of apoptosis in malignant B cells by phenylbutyrate or phenylacetate in combination with chemotherapeutic agents. *Clin. Cancer Res*. 2000; 6, 681-692.
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2011; 25, 679-684.
- Wyatt GR. Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature*. 1950; 166(4214), 237-238.
- Xie Q, Bai Q, Zou LY, Zhang QY, Zhou Y, Chang H, Yi L, Zhu JD, Mi MT. Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014; 53(5), 422-31.
- Xiong Z and Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(12), 2532-2534.
- Xu M., Kladde MP, Van Etten JL, Simpson RT. Cloning, characterization and expression of the gene coding for a cytosine-5-DNA methyltransferase recognizing GpC. *Nucleic acids research*. 1998; 26(17), 3961-3966.

- Xu F, Mao C *et al.* Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17(33), 4052-4071.
- Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, Barbera AJ, Zheng L, Zhang H, Huang S, Min J, Nicholson T, Chen T, Xu G, Shi Y, Zhang K, Shi YG. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell.* 2011; 42, 451-464.
- Yacqub-Usman K, Richardson A *et al.* The pituitary tumour epigenome: aberrations and prospects for targeted therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012; 8(8), 486-494.
- Yang AS, Estécio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(3), e38.
- Yang H. *et al.* Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk. Res.* 2005; 29, 739-748.
- Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR *et al.* Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia.* 2014; 28(6), 1280-8.
- Yang X, Lay F *et al.* Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 2010; 31(11), 536-546.
- Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014; 26(4), 577-90.
- Yaqinuddin A, Qureshi SA, Qazi R, Abbas F. Down-regulation of DNMT3b in PC3 cells effects locus-specific DNA methylation, and represses cellular growth and migration. *Cancer Cell Int.* 2008; (17)8, 13.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997; (8), 335-40. Review.
- Yoo J and Medina-Franco JL. Towards the chemoinformatic-based identification of DNA methyltransferase inhibitors: 2D- and 3D-similarity profile of screening libraries. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2012; 8(4), 317-329.
- Yoo J, Choi S, Medina-Franco JL. Molecular modeling studies of the novel inhibitors of DNA methyltransferases SGI-1027 and CBC12: implications for the mechanism of inhibition of DNMTs. *PLoS One.* 2013; 8(4), e62152.

- You JS, Kelly TK, De Carvalho DD, Taberlay PC, Liang G, Jones PA. OCT4 establishes and maintains nucleosome-depleted regions that provide additional layers of epigenetic regulation of its target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(35), 14497-502.
- You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012; 22(1),9-20. Review.
- Yuan GC, Liu YJ *et al*. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*. 2005 ; 309(5734), 626-630.
- Zaidi SK, Trombly DJ *et al*. Epigenetic mechanisms in leukemia. *Adv. Biol. Regul.* 2012; 52(3), 369-376.
- Zambrano P, Segura-Pacheco B *et al*. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC. Cancer*. 2005; 5, 44.
- Zhang Y, and Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*. 2001; 15 (18), 2343-60.
- Zhang Y, Li Q, Chen H. DNA methylation and histone modifications of Wnt genes by genistein during colon cancer development. *Carcinogenesis*. 2013; 34(8), 1756-63.
- Zhang Z. *et al*. Enhanced therapeutic effect on androgen-independent prostate cancer by depsipeptide (FK228), a histone deacetylase inhibitor, in combination with docetaxel. *Urology*. 2007; 70, 396-401.
- Zhang Z, Pugh BF. High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. *Cell*. 2011 ; 144(2), 175-86.
- Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD, Cunningham JM, Jane SM. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16(3):304-11.
- Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol*. 2002; 321(4), 591-9.
- Zhu B, Ge J, Yao SQ. Developing new chemical tools for DNA methyltransferase 1 (DNMT1): a small-molecule activity-based probe and novel tetrazole-containing inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2015; 23(12), 2917-27.
- Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*. 2007 ; 134(22), 3959-65.

Ouvrages:

Weinberg RA. The Biology of Cancer. *Garland Science*. 2006; 1st Edition.

Sites web:

<http://www.clinicaltrials.gov>

<http://dna.leeds.ac.uk/methylviewer/>

<http://epigenome.eu/>

<http://www.genome.gov/encode>

<https://genome.ucsc.edu/>

<http://services.ibc.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA/>

Study of the pharmacological effects of non-nucleoside inhibitors of DNA methylation

Epigenetic modifications participate to the control of gene expression. Methylation of deoxycytidines (dC) in the DNA was shown to play a key role in epigenetic regulation in mammals. It is the most stable epigenetic mark and occurs at CpG sites, which are grouped in islands and essentially located in promoters, repeated sequences and CpG island shores. Hypermethylation of promoters induces gene silencing while hypomethylation is associated to gene expression. Enzymes responsible for DNA methylation are the DNA methyltransferases (DNMTs). Two families of catalytically active DNMTs have been identified: DNMT1, mainly responsible for DNA methylation maintenance during replication; and DNMT3A and 3B that perform *de novo* DNA methylation and support maintenance. Alteration of DNA methylation patterns lead to various diseases such as cancer. Cancerous cells often present aberrant DNA methylation, in particular a specific hypermethylation of tumor suppressor genes is observed. Restoring their expression by inhibition of DNA methylation represents an attractive therapeutic strategy.

Several DNMTs inhibitors have been described. Two nucleoside analogs are FDA approved to treat leukemia: 5-azacytidine (VidazaTM) and 5-azadeoxycytidine (Dacogene[®]). Our laboratory develops since several years new inhibitors of DNMT, non-nucleoside analogs, targeting the catalytic site. Here, I studied the pharmacological effects of these DNMTs catalytic inhibitors using several cancer cell lines (leukemia, lymphoma and colon cancer) and different technologies to follow DNA methylation, chromatin accessibility, histone modifications and gene expression. Since epigenetic therapies aim at the reprogramming of cancer cells, I explored the long-term modifications induced by the compounds. We show that these novel compounds are potent inhibitors of DNMT3A and able to induce the expression of a reporter gene (luciferase) under the control of a methylated CMV promoter by demethylation of the promoter and opening of the chromatin. Finally, these new DNMTs inhibitors demethylate the promoter region of tumor suppressor genes and induce their re-expression.

Etude des effets pharmacologiques d'inhibiteurs non nucléosidiques de la méthylation de l'ADN

Les modifications épigénétiques participent au contrôle de l'expression génique. Il a été montré que la méthylation des désoxycytidines (dC) de l'ADN joue un rôle clé dans la régulation épigénétique chez les mammifères. Cette modification correspond à la marque épigénétique la plus stable. Elle a lieu sur des résidus CpG regroupés en îlots, essentiellement situés au niveau des séquences promotrices, des séquences répétées et des séquences encadrants les îlots CpG. L'hyperméthylation des promoteurs induit une inhibition de l'expression des gènes, tandis qu'une hypométhylation est associée à une expression. Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont les méthyltransférases d'ADN (DNMTs). Deux familles de DNMTs catalytiquement actives ont été identifiées: on distingue la DNMT1, principalement responsable de la maintenance de la méthylation de l'ADN lors de la réplication, et les DNMT3A et 3B, qui sont responsables d'une méthylation de l'ADN dite *de novo*. L'altération des profils de méthylation de l'ADN conduit à diverses maladies telles que le cancer. Les cellules cancéreuses présentent souvent un profil de méthylation de l'ADN différent des cellules saines, on observe en particulier une hyperméthylation spécifique des gènes dits suppresseurs de tumeur. Une restauration de leur expression par l'inhibition de la méthylation de l'ADN représente ainsi une stratégie thérapeutique attrayante.

Plusieurs inhibiteurs de DNMTs ont été décrits et deux analogues de nucléosides sont approuvés par la FDA pour traiter certaines leucémies: la 5-azacytidine (VidazaTM) et la 5-azadeoxycytidine (Dacogene[®]). Notre laboratoire développe depuis plusieurs années de nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de DNMTs qui ciblent leur site catalytique. J'ai étudié ici les effets pharmacologiques de ces inhibiteurs catalytiques des DNMTs, en utilisant plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (issues d'une leucémie, d'un lymphome et d'un cancer du côlon). J'ai utilisé pour cela différentes technologies permettant d'analyser la méthylation de l'ADN, l'accessibilité de la chromatine, les modifications des histones et l'expression des gènes. Ces nouvelles thérapies épigénétiques visent à la reprogrammation des cellules cancéreuses, c'est pourquoi j'ai exploré les modifications à long terme induites par ces nouveaux composés. Nous avons montré que ces composés sont des inhibiteurs puissants de DNMT3A et qu'ils sont capables d'induire l'expression d'un gène rapporteur (la luciférase) sous le contrôle du promoteur CMV, par une déméthylation de ce promoteur et une ouverture de la chromatine. Enfin, ces nouveaux inhibiteurs de DNMTs déméthylent la région promotrice de gènes suppresseurs de tumeurs et induisent leur ré-expression.